

**Untersuchungen zur Beeinflussung
der Nucleinsäuresynthesen in Leberzellen
durch das Flavonolignan Silibinin**

Isolde Zetl

*Ors
München
1985*

Untersuchungen zur Beeinflussung der Nucleinsäuresynthesen
in Leberzellen durch das Flavonolignan Silibinin

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Isolde Zetl
aus
München

Oktober 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Sonnenbichler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.85

Ich habe die Ehre, Ihnen hiermit zu erklären, dass ich die
Ehrendoktorwürde an der Universität zu Bonn verliehen habe.
Dieser Beschluss wurde am 1. März 1900 in der Sitzung des
Senats der Universität gefasst.

Die Ehrendoktorwürde ist eine Auszeichnung, die dem
Besitzer das Recht verleiht, an der Universität zu
dozieren und die Titel eines Professors zu führen.
Die Ehrendoktorwürde wird in der Regel an
ausländische Gelehrte verliehen, die in ihrer
Heimatsstadt eine hervorragende Stellung
einnehmen.

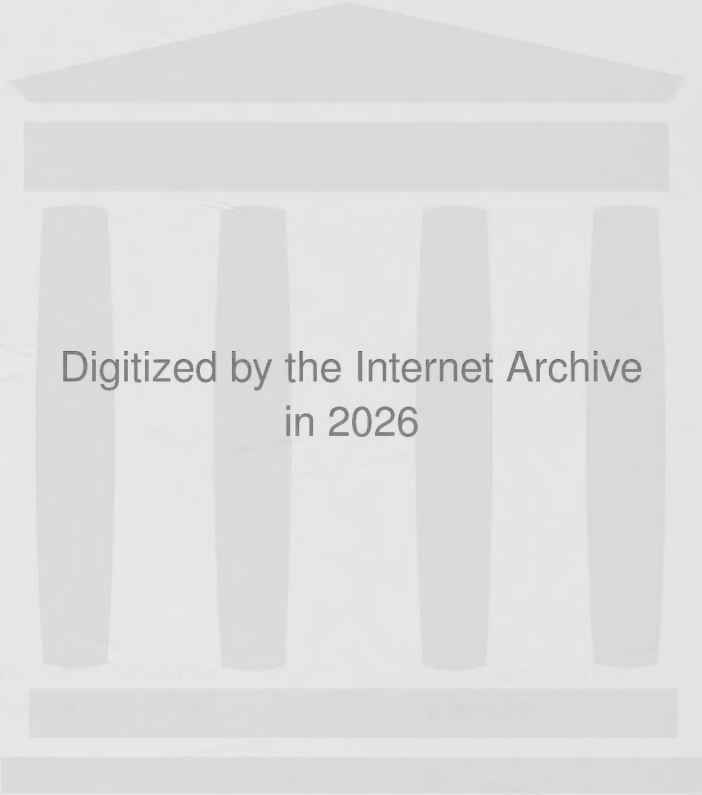
Die Ehrendoktorwürde wird in der Regel an
ausländische Gelehrte verliehen, die in ihrer
Heimatsstadt eine hervorragende Stellung
einnehmen.

Die Ehrendoktorwürde wird in der Regel an
ausländische Gelehrte verliehen, die in ihrer
Heimatsstadt eine hervorragende Stellung
einnehmen.

Die Ehrendoktorwürde wird in der Regel an
ausländische Gelehrte verliehen, die in ihrer
Heimatsstadt eine hervorragende Stellung
einnehmen.

Die Ehrendoktorwürde wird in der Regel an
ausländische Gelehrte verliehen, die in ihrer
Heimatsstadt eine hervorragende Stellung
einnehmen.

MEINEM VATER
IN DANKBARKEIT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0087

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München-Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler in der Zeit vom August 1982 bis August 1985 durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Sonnenbichler, dessen stete Förderung meiner nicht ganz üblichen Berufslaufbahn mir erst die Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit schaffte. Darüber hinaus möchte ich mich für seine allzeitige Bereitschaft zur Diskussion und Lösung aller angefallenen Aufgaben und Probleme bedanken, die für mich stets wertvolle Anregungen und Hilfestellungen waren.

Herrn Prof. Dr. Wagner danke ich für sein freundliches Entgegenkommen, das mir ermöglichte, meine Arbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Schäfer danke ich für die Messung und Diskussion der Massenspektren.

Herrn Dr. Goldberg und Herrn Dr. Vogel danke ich für die Hilfestellung bei den Versuchen zur Teilhepatektomie.

Meinen Kolleginnen und Kollegen Frau T. Schild, Frau L. Hane, Frau I. Bliestle, Herrn M. Veth und Herrn I. Madubunyi danke ich für kritische Diskussionen und eine angenehme Laboratmosphäre.

I. EINFÜHRUNG

1. Kurzer historischer Überblick	1
2. Einleitung	1

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Materialien	6
2. Methoden	8
2.1 Präparative Methoden	8
2.1.1 Isolierung und Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber	8
2.1.2 Isolierung der cytoplasmatischen RNA nach Loening (1967)	8
2.1.3 Isolierung der cytoplasmatischen RNA nach Perry et al. (1972)	9
2.1.4 Thermale Extraktion der RNA nach Brosard und Nicole (1968)	9
2.1.5 Kern-RNA nach Penman (1966)	10
2.1.6 Reinigung der Desoxyribonuclease von Ribonucleaseaktivität	10
2.1.7 Isolierung von Ribosomen nach Chandra (1973) und Poulson (1973)	11
2.1.8 Isolierung von DNA aus Rattenleber	11
2.1.9 Isolierung von DNA aus Zellkulturen	12
2.1.10 Reinigung der RNA-Polymerase I und II aus Rattenleberzellkernen	12
2.2 Analysenmethoden	14
2.2.1 Quantitative Bestimmungen von RNA, DNA und Protein	14

2.2.2	Messung der radioaktiven Anflutung in der Leber und der radioaktiven Nucleinsäuren	14
2.2.3	Messung der Precursoraufnahme in Hepatozyten von normalen Ratten und von teilhepatektomierten Ratten	14
2.2.4	Charakterisierung der RNA in Sucrosegradienten	15
2.2.5	Reinigung der Poly A - tragenden mRNAs nach Aviv und Leder (1972)	15
2.2.6	Agarosegelelektrophorese der RNA nach Rave et al. (1979)	16
2.2.7	Elektrophoretische Abtrennung der 4-6 S RNAs auf Polyacrylamid nach Blatt und Feldmann (1973)	16
2.2.8	Transkriptionstest mit gereinigten Kernen	17
2.2.9	Transkriptionstest mit gereinigten Polymerasen	17
2.2.10	Isopyknische Zentrifugation mit ^3H -Silibinin markiertem Chromatin	18
2.3	Durchführung einer Teilhepatektomie nach Higgins und Anderson (1931)	18
2.4	Zellkulturen	19
2.4.1	Burkitt-Lymphoma-Zellen. Linie Raji	19
2.4.2	HeLa-Zellen und menschliche Hepatomzellen der Zelllinie Alexander	20
2.4.3	Zajdela-Ascites-Hepatom-Zellen	20
2.4.4	Isolierung und Inkubation von Hepatozyten	21
2.5	Jodierung von Silibinin	23

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Untersuchungen zur Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silibinin in vivo	25
1.1 Steigerung der RNA-Synthese unter dem Einfluß von Silibinin in vivo	26
1.2 Dosisabhängigkeit der RNA-Synthesesteigerung	28
1.3 Dauer des Silibinineffektes auf die RNA-Synthese in der Rattenleber	29
1.4 Analyse der unter dem Einfluß von Silibinin beschleunigt synthetisierten RNA-Typen	31
1.4.1 Auftrennung der in vivo markierten Gesamt-RNA durch Ultrazentrifugation in Sucrosegradienten	31
1.4.2 Elektrophoretische Analyse der in vivo markierten Gesamt-RNA	34
1.4.3 Analyse der 5,8S-, 5S- und t-RNA unter dem Einfluß von Silibinin	36
1.4.4 m-RNA Synthese und Silibinin	39
1.5 Einfluß des Silibinin auf die in Ribosomen eingebauten rRNAs und die Ribosomensynthese	40
1.5.1 Zeitverlauf der rRNA-Markierung in Ribosomen	40
1.5.2 Zeitlicher Verlauf der Silibininwirkung	41
1.5.3 Ribosomale Proteine	42
1.6 Zusammenfassende Diskussion zur Beeinflussung der RNA-Synthese in Rattenlebern durch Silibinin	44

2.	Gedanken und Versuchsansätze zur Wechselwirkung von Silibinin mit dem Transkriptionskomplex der Polymerase I	48
2.1	Hypothese eines steroidähnlichen Wirkungsmechanismus	48
2.2	Versuche zur Bindung von Silibinin an Komponenten des Transkriptionskomplexes	55
2.2.1	Versuche mit ^3H -Silibinin	55
2.2.2	Markierung von Silibinin mit Jod	56
2.2.3	In-vitro-Transkriptionsteste mit dem Monojodderivat	56
3.	Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Synthese in Rattenlebern und Zellkulturen durch Silibinin	59
3.1	Bestimmungen der Precursorkonzentrationen	60
3.2	DNA-Synthese in normalen Rattenlebern mit und ohne Silibininvorbehandlung	62
3.3	Einfluß von Silibinin auf die DNA-Synthese in Lebern von teilhepatektomierten Ratten	64
3.3.1	Steigerung der DNA-Synthese unter dem Einfluß von Silibinin in vivo	64
3.3.2	Zeitverlauf der DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern unter dem Einfluß von Silibinin	66
3.4	DNA-Synthese in malignen Zelllinien in Gegenwart von Silibinin	68

3.5 Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der DNA-Synthese durch Silibinin	72
IV. ANHANG	76
1. Jodierung von Silibinin	76
2. Spektroskopische Charakterisierung der Jodderivate	78
V. ZUSAMMENFASSUNG	86
VI. LITERATUR	90
Abkürzungen	98
Lebenslauf	99

I. EINFÜHRUNG

1. Kurzer historischer Überblick

Die Mariendistel - *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.) ist eine seit dem Altertum bekannte Arzneipflanze. Sie wird bereits bei Theophrast* (4. Jh. v. Chr.) und Dioskurides* (1. Jh. n. Chr.) beschrieben und hat in die Kräuterbücher von Hieronymus Bock* (1595), Jacobus Theodorus* (1664), Adamo Lonicero* (1679) und Valentini* (1719) Aufnahme gefunden.

Von Haller erwähnt 1755 in seinem "Medicinisches Lexicon" Mariendistelkraut zur Behandlung aller Gebrechen der Leber. Rademacher (1848) empfiehlt Abkochungen und Tinkturen der Früchte bei chronischen Leber- und Milzleiden, akuter Hepatitis mit Seitenstechen und Ikterus.

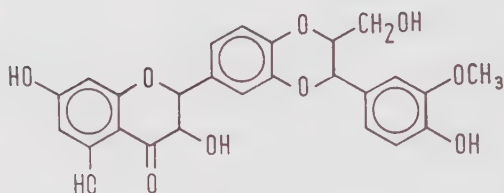
Auch das DAB 8 enthält eine Monographie über die Mariendistelfrüchte, aus denen das wirksame Prinzip von Janiak und Hänsel (1960) isoliert werden konnte. Nach Aufklärung der Struktur des leberwirksamen Inhaltsstoffes Silibinin durch Wagner et al. (1965) und Pelter und Hansel (1968), gelang Mishima et al. (1971) die Totalsynthese.

2. Einleitung

Bei dem genannten Wirkstoff der Mariendistel handelt es sich um ein Flavonolignan, in dem das Flavanonol Taxifolin mit Coniferylalkohol benzodioxanartig verknüpft ist. Von der

* Zitate aus Hahn et al. (1968) und Wagner et al. (1968)

WHO wurde für die Substanz der Name Silibinin festgelegt, was gleichbedeutend mit dem früheren Namen Silybin ist. Die außerdem ehemals häufig verwendete Bezeichnung Silymarin ist ein Überbegriff für das Gemisch mehrerer aus dem Methanolextrakt von Mariendistelfrüchten gewonnenen Substanzen, deren Strukturen mittlerweile alle aufgeklärt sind (Wagner et al., 1971, Wagner et al., 1976). Die stereochemische Konfiguration von Silibinin wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von Lotter und Wagner (1983) bestimmt.



Silibinin

Auch zur Pharmakologie und Biochemie von Silibinin wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, von denen hier nur einige herausgegriffen seien. So konnten Vogel und Temme (1969) an Mauselebern eine antagonistische Wirkung des Flavonolignans gegenüber Phalloidin und α -Amanitin zeigen, was von Frimmer und Kroker (1975) bestätigt wurde. Rauen und Schriewer (1971) wiesen bei Ratten einen protektiven und curativen Effekt nach Schädigung der Leber mit Tetrachlorkohlenstoff, D-Galactosamin und Thioacetamid über die Messung der Aktivität leberspezifischer Enzyme (GOT, SDH, GLDH, GPT) nach. Sie fanden ferner, daß der pathologische Anstieg freier Fettsäuren im Plasma bei Gabe von Silibinin

verhindert wird (Schriewer et al. 1973).

Magliulo et al. (1973) beobachteten nach Teilhepatektomie eine gesteigerte Regenerationsfähigkeit der Lebern mit einer erhöhten Mitose-Rate (1979).

Sonnenbichler et al. (1976) untersuchten den Einfluß von Silibinin auf den Transkriptionsprozeß. Bei isolierten Hepatozyten in vitro konnte festgestellt werden, daß nach Gabe von Silibinin eine beschleunigte Synthese der RNA zu beobachten war. Weitere Experimente von Rosen (1980) lieferten Zeit- und Dosisabhängigkeit dieser Stimulierung bei isolierten Hepatozyten. Ferner begann Rosen, den Einfluß auf die Proteinsynthese zu untersuchen.

Machicao und Sonnenbichler (1977) beschäftigten sich mit der Frage, wie der Effekt der gesteigerten RNA-Synthese zustande kommt. In in vitro Systemen mit Zellkernen und Nukleolen konnte nachgewiesen werden, daß auch hierbei RNA schneller produziert wird. Nach Isolierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen konnte schließlich gezeigt werden, daß Silibinin die Transkription durch RNA-Polymerase I stimuliert.

Am Beginn dieser Arbeit war also eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der RNA-Polymerase I Reaktion in vitro und eine Beschleunigung der RNA-Synthese in Hepatozytenkulturen durch Silibinin bekannt. In diesem Zusammenhang blieb aber eine Reihe von Fragen noch unbeantwortet:

1. Unbekannt war, ob Silibinin auch in vivo am Gesamttier eine beschleunigte RNA-Synthese in der Leber bewirkt. Diesbezüglich werden entsprechende Experimente durchgeführt. Der Zeitverlauf der Silibininwirkung, die Dosisabhängigkeit und die Dauer des Silibinineffektes werden unter in vivo Bedingungen untersucht und

beschrieben.

2. Da an isolierter RNA-Polymerase I, die die ribosomalen RNAs transkribiert, eine Enzymaktivierung durch Silibinin gemessen werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß auch in vivo die r-RNA vermehrt gebildet werden könnte. Dies war jedoch nicht bewiesen und erst die quantitative Bestimmung der Synthesegeschwindigkeit aller in vivo gebildeten RNA-Spezies mit und ohne Silibinin kann eine Klärung geben, ob ein bestimmter RNA-Typ beschleunigt synthetisiert wird; entsprechende Analysen werden durchgeführt.

3. Ferner ist die Frage offen, über welchen Detailmechanismus der Pflanzeninhaltsstoff Silibinin in den äußerst komplizierten Prozeß der Transkription bei Eukaryonten eingreift. Von Sonnenbichler und Pohl waren bereits 1980 eine Reihe von Flavonoiden in in vitro Transkriptionssystemen getestet worden und nach Vergleich der wenigen aktiven Substanzen wurden Strukturähnlichkeiten mit dem Sterangerüst vermutet. In dieser Arbeit werden erste Versuche unternommen, diese Hypothese zu erhärten.
In einer Literaturrecherche werden zahlreiche Hinweise erarbeitet und zusammengestellt, die tatsächlich eine Verwechslung von Silibinin mit Steroiden an Rezeptorstellen denkbar werden lassen.
Pilotexperimente zur Frage, ob Silibinin an den Transkriptionskomplex bindet, werden mit radioaktivem ^3H -Silibinin durchgeführt. Zusätzlich wird ein Verfahren zur Markierung von Silibinin mit ^{131}I -Jod ausgearbeitet.

4. Es ist bekannt, daß die RNA-Synthese unter anderen ein geschwindigkeitsbeeinflussender Schritt für die DNA-Synthese ist. Es erscheint deshalb auch

interessant, die Frage zu klären, ob mit der Änderung der RNA-Synthesegeschwindigkeit zugleich eine (sekundäre) Beeinflussung der DNA-Synthese einhergeht. An normalen und teilhepatektomierten Ratten wird die DNA-Synthese in den Lebern unter dem Einfluß von Silibinin untersucht.

Darüber hinaus wird in mehreren malignen Zellkulturen der Effekt des Flavonolignans auf die Proliferationsrate und DNA-Replikation gemessen.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Materialien

Acrylamid, Serva, Heidelberg

Agarose Sea Plaque, Marine Colloids Div., Rockland, ME, USA

Altromin 1324, Fa. Altromin, Lage

Aquasol-2, NEN, Dreieich

Baykovin, Bayer, Leverkusen

Bis-Acrylamid, Serva, Heidelberg

Celluloseacetatfolien (=Cellogel), Chemetron, Mailand

DEAE-Sephadex A25, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

DNase I, Boehringer, Mannheim

Dithioerythrit, Serva, Heidelberg

EDTA (Titriplex III), Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Boehringer, Mannheim

Falcon-Kulturflaschen, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Heparin, Novo-Industrie, Mainz

Heparin-Sepharose CL 6B, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

Hepes, Serva, Heidelberg

Kalberserum foetales, Biochrom, Berlin

Kieselgel 60_{F254}-Fertigplatten, Merck, Darmstadt

Kollagenase, Worthington, New Jersey

Medium RPMI 1640, Biochrom, Berlin

Narcoren, Iffa Merieux, Laupheim

Natriumjodacetat, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumaminosalicylat, Serva, Heidelberg
Natriumtriisopropyl-naphthalinsulfonat, Serva, Heidelberg
Nitrocellulosefilter, Sartorius, Göttingen
Nucleosidphosphate, Serva, Boehringer

Oligo-(dT)-Cellulose, Coll. Research, Inc. Mass., USA

¹⁴C-Orotsaure, NEN, Dreieich

³H-Orotsaure, NEN, Dreieich

Penicillin, Biochrom, Berlin

Phenylquecksilberacetat, Sigma, Taufkirchen

PMSF, Merck, Darmstadt

SDS, Serva, Heidelberg

Silibinin, Madaus, Köln

Silibinin-2',3-dihydrogensuccinat, Na-salz, Madaus, Köln

Streptomycin, Biochrom, Berlin

¹⁴C-Thymidin, Amersham-Buchler, Braunschweig

³H-Thymidin, Amersham-Buchler, Braunschweig

Triton X100, Serva, Heidelberg

Trypanblau, Serva, Heidelberg

Trypsin, Biochrom, Berlin

³H-UTP, NEN, Dreieich

Xylencyanol FF-Blau, Serva, Heidelberg

2. Methoden

2.1 Präparative Methoden

2.1.1 Isolierung und Reinigung von Zellkernen aus Rattenleber

Ratten wurden durch Ethernarkose getötet, die Lebern entnommen und in kalter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Alle weiteren Operationen wurden bei 4° durchgeführt. Je eine Leber wurde in 60 ml 0,32 M Sucrose, 2mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl, pH 7,0 mit einem motorgetriebenen Glas-Teflon-Potter homogenisiert (2 x 2500 UpM, 3 x 5000 UpM), durch 4 Lagen Mull filtriert und 15 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Niederschlag einer Leber wurde in 20 ml 2,2M Sucrose, 1mM $MgCl_2$, 10mM Tris-HCl, pH 7,0 aufgenommen, im Handpotter 3 mal homogenisiert und in Zentrifugenbecher geschichtet, die bereits zu 1/5 mit dem gleichen Puffer gefüllt waren. Die Zentrifugation erfolgte 90 min bei 40000 xg. Die weißen Kernpellets wurden in Einfrierpuffer nach Fodor u. Doty (1977), bestehend aus 25 % Glycerin, 5mM $MgCl_2$, 10mM Tris, 0,2mM Edta, 5mM DTE, pH 7,5 mit dem Handhomogenisator 3 mal suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.2 Isolierung der cytoplasmatischen RNA nach Loening (1967)

Die Cytoplasmaüberstände der Kernisolierung wurden im Verhältnis 1:1 mit einer Lösung, die 1% Natriumtriisopropyl-naphthalinsulfonat, 6% Natriumaminosalicylat, 1% NaCl und 6% Phenol/Kresol enthielt, versetzt und 5min bei Raumtemperatur geschüttelt. Zu diesem Gemisch wurde das gleiche Volumen

Phenol/Kresol (500g frischdest. wassergesatt. Phenol, 70g frischdest. Kresol, 0.5g 8-Hydroxychinolin) gegeben, 10 min geschüttelt und bei 10000xg die Phasen getrennt. Nach Entfernen der Phenolphase wurden die Wasserphase und die Interphase auf 0.3M NaCl gebracht und noch zweimal mit dem Phenol/Kresolgemisch extrahiert. Anschließend wurde einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 ausgeschüttelt. Aus der Wasserphase läßt sich die cytoplasmatische RNA mit 2.5 Vol. Ethanol bei -30°C präzipitieren.

2.1.3 Isolierung der cytoplasmatischen RNA nach Perry et al. (1972)

Die Cytoplasmafraktion der Kernisolierung wurde zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform (1:1) jeweils 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Phenol war vorher durch Schütteln mit einem Puffer aus 0.01M Natriumacetat, pH 6.0, 0.1M NaCl, 1mM EDTA wassergesättigt und neutralisiert worden. Phenol- und Interphasen der zwei ersten Extraktionsschritte wurden mit 0.01M Trispuffer, pH 7.4, 1mM EDTA, 0.1M NaCl und 0.5% SDS reextrahiert. Die Wasserphasen wurden vereint und mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 extrahiert. Nach Zusatz von NaCl bis zur Endkonzentration von 0.1M läßt sich die cytoplasmatische RNA mit 2.5 Vol. Ethanol bei -30°C präzipitieren.

2.1.4 Thermale Extraktion der RNA nach Brossard und Nicole (1968)

Die gewaschene Leber wurde sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Gemisch aus Phenol (mit 0.1% 8-Hydroxychinolin) und Puffer (0.1M Tris, pH 5.1, 0.5% Natriumtriisopropyl-naphthalinsulfonat, 1% Baykolin) (je 10ml pro 1 g Leber) homogenisiert. Nach kurzem Schütteln der Suspension bei Raumtemperatur wurden durch Zentrifugation die Phasen getrennt: dann wurde die Phenolphase einmal mit

dem waßr. Puffer reextrahiert. Die vereinigten Wasserphasen wurden mit der Hälfte der ursprünglichen Menge Phenol 15 min geschüttelt und die Phasen wieder getrennt. Nach Zugabe von NaCl auf eine Endkonzentration von 0.1M zur Wasserphase wurde die RNA mit 2.5 Vol. Ethanol präzipitiert, wieder in 2M Natriumacetat aufgenommen und erneut mit 1/3 Vol. Ethanol bei -30° C gefällt (cytoplasmatische RNA).

Die Interphase der zweiten Phenolextraktion wurde im Handhomogenisator mit frischdest. Phenol und Puffer (0.1M Tris, pH 5.1, 0.5% SDS) gemischt, dann 6 min bei 65° C geschüttelt. Die Phenolisierungsschritte wurden wie oben wiederholt, dann aus der Wasserphase die RNA mit Ethanol präzipitiert (Kern-RNA).

2.1.5 Kern-RNA nach Penman (1966)

Die gereinigten Kerne wurden abzentrifugiert und in 0.5M NaCl, 0.05M $MgCl_2$, 0.01 Tris, pH 7.4, auf Raumtemperatur gebracht. Mit vorgereinigter Desoxyribonuclease I ($50\mu g/ml$) wurde die DNA in 10 min bei Raumtemperatur weitgehend abgebaut und dann die Lösung auf 0.5% Natriumdodecylsulfat und 0.1M EDTA eingestellt. Nach Zugabe desselben Volumens Phenol wurde 2 min auf 55° C erhitzt, wiederum ein gleiches Volumen Chloroform mit 1 % Isoamylalkohol zugefügt und nochmals auf 55° C erhitzt. Durch kurzzeitige Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und die Extraktion von Wasser- und Interphase so lange mit Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt, bis die Interphase verschwunden war. Fällung der Kern-RNA mit 2,5 Vol. Ethanol bei -30° .

2.1.6 Reinigung der Desoxyribonuclease von Ribonucleaseaktivität

10 mg DNase I wurden in 2 ml 2.5 mM HCl gelöst und zwei Tage gegen die gleiche HCl-Lösung bei 0° C dialysiert. Dann wurden 2.5 ml 0.2 M Natriumacetat, pH 5.3 und 0.75ml 1 M Natriumjodacetat zugegeben und 1 h auf 55° C erhitzt. Nach Dialyse gegen 2.5 mM HCl wurde 1 h bei 10000xg zen-

trifugiert. Im Überstand sind ca. 2mg/ml gereinigte DNase I.

2.1.7 Isolierung von Ribosomen nach Chandra (1973) und Poulson (1973)

Jeweils eine Rattenleber wurde mit 23 ml einer Lösung aus 1.4 M Sucrose, 0.1 M KCl, 0.12 M KHCO_3 , 0.08 M K_2HPO_4 , 0.01% Baykovin, pH 7.4 (0.1 N HCl) homogenisiert. Durch Zentrifugation 30 min bei 27000xg wurden Zellkerne und Mitochondrien abgetrennt. Der Überstand wurde 70 min bei 105000xg zentrifugiert und die sedimentierten Mikrosomen in 45 ml folgender Lösung suspendiert: 1.4M Sucrose, 0.1M KCl, 0.036M MgCl_2 , 0.004M DTE, 0.01% Baykovin. Nach Zugabe von 4,5ml 10% Triton wurde 15 min gerührt und anschließend 70 min bei 105000xg zentrifugiert. Das Sediment wurde schonend in 45ml 0.001 M MgCl_2 , 0.01% Baykovin suspendiert und festes MgCl_2 bis zur Endkonzentration von 0.05M hinzugefügt. Nach einer erneuten Zentrifugation (30 min, 27000xg) erhält man ein Ribosomenpellet, das 2 mal mit je 18ml 0.01 M MgCl_2 , 0.01% Baykovin gewaschen und zur Analytik in 3ml 0.01M Tris, 0.1M NaCl, 0.001M MgCl_2 , 2% Natriumdodecylsulfat, pH 7, gelöst wurde.

2.1.8 Isolierung von DNA aus Rattenleber

Die Ratten wurden durch Ethernarkose getötet, die Lebern entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, gewogen, in 9fachem Volumen 0,32M Sucrose, 3mM MgCl_2 , 10mM Tris, pH 7,5 homogenisiert, durch ein 150 μ Filter filtriert und bei 1200 x g 10 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 0,32M Sucrose suspendiert und durch das 5fache Volumen 60 % Sucrose 5 min bei 9000 xg zentrifugiert.

Aliquots der Kernpellets wurden in 3 ml 0,25M HClO_4 suspendiert und 30 min. bei 4° C aufbewahrt.

Nach einer Zentrifugation 15 min bei 4000 xg wurde zu jedem Pellet 0,5 ml 0,5N NaOH gegeben und die Proben 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurden 4,5 ml 0,5M HClO_4 zupipettiert und nachdem das Material 30 min bei 4° stand,

wurde erneut 15 min bei 4000 xg abzentrifugiert. Anschließend wurden die Niederschläge 20 min in 2,5 ml 0,5M HClO₄ gekocht, abzentrifugiert und der Überstand aufgehoben. Die Hitzeextraktion wurde wiederholt, die beiden Überstände vereinigt und zur Analyse der DNA verwendet.

2.1.9 Isolierung von DNA aus Zellkulturen

Um aus HeLa, Raji, Alexander bzw. Zajdela-Zellkulturen DNA zu isolieren, wurden die Zellen zunächst bei 1500 g aus ihrem jeweiligen Medium abzentrifugiert, zweimal in 0,32M Sucrose, 3mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen, erneut im gleichen Puffer suspendiert und leicht homogenisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation 10 min bei 1200 xg wurden die abgetrennten Zellkerne über 60% Sucrose gereinigt. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten analog 2.1.8.

2.1.10 Reinigung der RNA-Polymerase I und II aus Rattenleberzellkernen

Benötigter Puffer: Puffer AS(x) (Roeder u. Rutter, 1969)
 50mM Tris-HCl, pH 7,9, 5mM Magnesiumchlorid, 0,1mM EDTA, 0,5mM DTE, 30% Glycerin, x mM Ammoniumsulfat (x = 0 - 2000). DTE wurde erst kurz vor Verwendung der Puffer zugegeben. Sämtliche Operationen wurden bei 0° - 4° C durchgeführt. Rattenleberzellkerne aus 35 Ratten (= 1.6×10^{10} Kerne), die im Einfrierpuffer nach Fodor und Doty (1977) eingefroren waren, wurden nach Zentrifugation in Puffer AS₀ homogenisiert. Durch Zugabe von Puffer AS₂₀₀₀ wurde die Ionenstärke auf 300mM AS gebracht. Die hochviskose Lösung wurde 3 x 10 sec ultrabeschallt (Branson sonifier, Modell S75, microtip, Stellung 7, Stromstärke 3A) und die Ionenstärke durch Zugabe von 2 Volumen Puffer AS₀ auf 100mM AS erniedrigt.

Die Suspension wurde 30 min auf einem Magnetrührer gerührt und dann abzentrifugiert (30 min, 28000 UpM, Kontron SW28 Rotor, 80000 x g). Das Pellet (Chromatin) wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 7 % PEG 6000 vorgefällt, 15 min

gerührt und 20 min bei 28000 UpM wie oben abzentrifugiert. Der neue Überstand wurde auf eine Endkonzentration von 25 % PEG 6000 gebracht, 30 min gerührt und 20 min wie oben zentrifugiert.

Das Pellet wurde in Puffer $AS_{2,0}$ 2 1/2 h im Eisbad gerührt und eingefroren.

Die Probe wurde aufgetaut, abzentrifugiert und 1:1 mit AS_0 verdünnt. Dann erfolgte Zugabe von ca. 2 ml feuchtem DEAE-Sephadex $A_{2,5}$, das in Puffer $AS_{1,0}$ equilibriert war. Nachdem dieses Gemisch 10 min in Eis stand, wurde es 5 min in einer Christ Minifuge bei 50 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen, auf eine AS -Konzentration von 25mM gebracht und sofort auf eine DEAE-Sephadex $A_{2,5}$ -Säule, die in 25 mM AS equilibriert war, aufgetragen (Säulenvolumen 20 ml). Das Gel im Zentrifugenglas wurde 2 x mit je 2,5 ml $AS_{1,0}$ gewaschen, abzentrifugiert und das Gel im Eisbad stehengelassen. Die Überstände wiederum auf $AS_{2,5}$ gebracht und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit $AS_{2,5}$ nachgewaschen, dann wurden die obengenannten 2 ml Gel auf die Säule aufgebracht und mit $AS_{1,0}$ eluiert. Das Eluat wurde mittels eines UV-Detektors bei 280 nm vermessen. Mit den Einzelfraktionen der Peaks wurden zur Erfassung der enzymhaltigen Proben Transkriptionsteste durchgeführt (wie unter 2.2.9 beschrieben), die zeigten, daß mit $AS_{1,0}$ Polymerase I eluiert wird. Anschließend wurde die Säule mit $AS_{3,0}$ eluiert und man erhielt Polymerase II, was wiederum durch Transkriptionsteste nachgewiesen wurde. Polymerase I wurde sofort auf eine Heparin-Sepharose-Säule aufgetragen, die in $AS_{1,0}$ equilibriert war (Säulenvolumen 5 ml) und mit 2 Säulenvolumen $AS_{1,0}$ gewaschen. Polymerase II wurde sofort auf eine Heparin-Sepharose-Säule, die in $AS_{3,0}$ equilibriert war, (Säulenvolumen 5 ml) und ebenfalls mit 2 Säulenvolumen $AS_{3,0}$ gewaschen.

Die Elution der jeweiligen Polymerasen erfolgte in beiden Fällen mit $AS_{3,0}$.

2.2 Analysenmethoden

2.2.1 Quantitative Bestimmungen von RNA, DNA und Protein

RNA wurde durch Messung der E_{260} -Werte oder mit Orcin nach Mejbaum (1939) bestimmt. Die DNA-Bestimmungen wurden nach Burton (1956) durchgeführt. Die Proteinbestimmung erfolgte durch Tupfeln auf Celluloseacetatfolien und Anfärbung mit Amidoschwarz nach Heil und Zillig (1970).

2.2.2 Messung der radioaktiven Anflutung in der Leber und der radioaktiven Nucleinsäuren

Ca. 100mg schwere Leberproben wurden entnommen, zerkleinert, mit 1ml Protosol in Glasszintillationsgefäßen verschlossen über Nacht bei 55°C stehengelassen. Nach Abkühlung wurde zur Entfärbung 0,5 ml H_2O_2 (30%) zugegeben, mit Aquasol-2 gelöst und die Radioaktivität bestimmt. In ähnlicher Weise wurden Aliquots der Leberhomogenate behandelt und gemessen. Die Radioaktivität gelöster RNA- und DNA-Proben wurde in einem Dioxanszintillator nach Bray (1960) oder nach Kobayashi und Mandsley (1974) gemessen.

2.2.3 Messung der Precursoraufnahme in Hepatozyten von normalen Ratten und von teilhepatektomierten Ratten

Spezifisch pathogenfreie Wistarratten bekamen 20 h vor dem Töten 2,7 mg/100 g SIHS, die Kontrolltiere nur 0,9 % NaCl. Die Teilhepatektomien wurden ebenfalls 20 h vor dem Töten durchgeführt und sofort SIHS bzw. 0,9 % NaCl i.p. injiziert. Aus allen Tieren wurden Hepatozyten isoliert, siehe 2.4.4.

Zu den Hepatozyten in Kultur (5×10^4 Zellen/ml) wurden je 1,67 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin zugesetzt. Nach 30 min Inkubation wurden jeweils 250 μl Proben entnommen, bei 0° 1 min/50 xg

zentrifugiert und nochmal mit 250 μ l Medium gewaschen. Nach insgesamt 4 min wurde zu den Pellets 10 % TCA zugesetzt und nach einer Zentrifugation bei 1500 xg die Radioaktivität in den Überständen gemessen.

2.2.4 Charakterisierung der RNA in Sucrosegradienten

RNA wurde in einem Puffer mit 0.1 M NaCl, 1mM EDTA, 0.5% Natriumdodecylsulfat, 0.1% Baykovin, pH 7.5 und 25% Formamid gelöst. In 13 ml Bechern wurden 20-50 E_{260} -Einheiten 15 h mit 70000xg durch einen Sucrosegradienten von 15-30% im gleichen Puffer ohne Formamid bei 25° zentrifugiert. Die Röhrchen wurden durch Einpumpen von 50% Sucrose entleert, der Inhalt fraktioniert und E_{260} gemessen. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit Aquasol-2 + 3 % Wasser.

2.2.5 Reinigung der Poly A - tragenden mRNAs nach Aviv und Leder (1972)

RNA wurde in "Elutionspuffer" in einer Konzentration von 5mg/ml gelöst und 5 min auf 65° erhitzt, schnell abgekühlt und mit einem gleichen Volumen doppelt konzentrierten "Bindungspuffer" gemischt. Kleine Säulen mit 2g Oligo-(dT)-Cellulose wurden mit "Bindungspuffer" (5 Säulenvolumen) gewaschen, dann die RNA-Lösung bei Raumtemperatur aufgetragen, mit wenig "Bindungspuffer" eluiert und das Eluat erneut aufgetragen (Recycling). Nach Waschen der beladenen Säulen mit 5 - 8 Säulenvolumen "Bindungspuffer" (10 ml/h) wurden die mRNAs mit 2-3 Volumen "Elutionspuffer" eluiert. Von den erhaltenen Fraktionen wurde E_{260} und die Radioaktivität bestimmt.

Bindungspuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7.6
1 mM EDTA
0.4 M NaCl
0.1% SDS

Elutionspuffer:

10 mM Tris/HCl pH 7.6
1 mM EDTA
0.1% SDS

2.2.6 Agarosegelelektrophorese der RNA nach Rave et al. (1979)

Die Elektrophorese wurde an 0,75 proz. Agarose-Plattengelen, (5 mm dick) in 0.018M Na_2HPO_4 , 0.002 M NaH_2PO_4 , 6 % Formaldehyd im sogenannten "Submarinverfahren" durchgeführt. Die RNA wurde in obengenannten Phosphatpuffer mit 6% Formaldehyd und 50% Formamid bei 60° (5min) gelöst und jeweils gleiche Mengen (1-3 E_{260} Einheiten) nach Zusatz von einem halben Volumen Glycerin : Formamid (1 : 1) aufgetragen. Nach 15-17 h Elektrophorese bei 30 V wurde mit Ethidiumbromid (1mg / L) in 0.1 M NH_4 acetat 30 min angefarbt und 1 h mit H_2O bei Raumtemperatur entfärbt. Zur Bestimmung der Radioaktivität der RNA wurden die Gele geschnitten, die Gelstücke mit 0.5ml 1N HCl versetzt, 1/2 h im Trockenschrank auf 80° C erhitzt und nach Zusatz von Aquasol-2 gezählt.

2.2.7 Elektrophoretische Abtrennung der 4-6 S RNAs auf Polyacrylamid nach Blatt und Feldmann (1973)

Die t-RNAs wurden aufgetrennt auf 10-proz. Polyacrylamidgele (9,5 Teile Acrylamid + 0,5 Teile Bis-Acrylamid) in einem Puffer bestehend aus 0.1 M Tris, pH 8.3, 2 mM EDTA, 0.1 M Borsäure, 7 M Harnstoff. Geldicke 0,3 cm, Laufstrecke ca. 40 cm, Vorelektrophorese 15 min 600 V, Auftrennung 15 h bei 500 V, 4° C. Gleiche Mengen RNA wurden in 0.018 M Na_2HPO_4 , 0.002 M NaH_2PO_4 , 50% Formamid gelöst, 5 min auf 60° C erhitzt und schnell abgekühlt. Dann wurde ein halbes Volumen eines Gemisches aus Glycerin und Formamid (1:1) mit etwas Xylencyanol FF-Blau als Frontindikator zugegeben. Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid im Laufpuffer ohne Harnstoff. Nach dem Schneiden wurden die Gelstücke zerrieben, mehrfach mit etwa gleichen Volumina 0.5 M NaCl extrahiert, die RNA mit 2 Vol. Ethanol präzipitiert und analysiert.

2.2.8 Transkriptionstest mit gereinigten Kernen

Um ein Maß für die RNA-Synthese zu erhalten, wurde der Einbau von ^3H UTP in saureprazipitierbares Material bestimmt.

Pro Einzeltest wurden 2×10^6 Kerne eingesetzt, die in 100 μl folgender Lösung suspendiert waren:

125 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 3 mM DTE, 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 2 mM MnCl_2 , 0,6 mM ATP, 0,6 mM GTP, 0,6 mM CTP, 0,015 mM UTP (nicht radioaktiv) und 1 μCi ^3H UTP (spez. Aktivität 37 Ci/mmol). Silibinin bzw. die zu testende Substanz wurde in der Regel in DMSO/ H_2O 1:1 gelöst, wobei die Kontrollwerte stets die gleiche Menge DMSO/ H_2O enthielten.

Nach unterschiedlich langer Inkubation bei 37° C wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen, 50 μl RNA-Lösung (3 mg/ml RNA, 0,01 % Phenylquecksilberacetat, 1 mM PMSF) dazupipettiert und die Reaktion durch Zugabe von eiskalter 10 % TCA mit 0,02 M Tetranatriumpyrophosphat gestoppt. Nachdem die Proben mindestens 15 min in Eis standen, wurde unter Unterdruck über Nitrocellulosefilter abgesaugt. Die Filter wurden mit je 25 ml 10 % und 5 % TCA (beide 0,02 M Tetranatriumpyrophosphat) gewaschen, 30 min bei 60° C getrocknet, mit einem Szintillator nach Bray (1960) aufgelöst, 30 min geschüttelt und die Radioaktivität in einem Packard-Szintillationscounter gezählt.

2.2.9 Transkriptionstest mit gereinigten Polymerasen

Die Durchführung erfolgte analog 2.2.8, jedoch mit geänderter Zusammensetzung des Testmix, der folgende Endkonzentrationen aufwies:

50 mM Hepes, pH 8,1, 5 mM Mg Acetat, 12 mM 2-ME, 1 mM MnCl_2 , 0,6 mM ATP, GTP, CTP, 0,06 mM UTP, 0,750 μCi ^3H UTP, bei Testen mit Polymerase II zusätzlich 150 mM KCl.

Zur Charakterisierung der unterschiedlichen Polymerase Typen müssen zusätzlich Testreihen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 150 $\mu\text{g/ml}$ Amanitin durchgeführt werden. Polymerase I ist Amanitin unempfindlich, Polymerase II wird bereits bei 2 $\mu\text{g/ml}$ Amanitin

vollig gehemmt, wohingegen Polymerase III erst bei einer Konzentration von 150 µg/ml inaktiviert wird.

2.2.10 Isopyknische Zentrifugation mit ³H-Silibinin markiertem Chromatin

Zur Markierung des Chromatins erhielten 150 - 200 g schwere Wistarratten 100 µCi ³H-Silibinin und 20 mg unmarkiertes Silibinin in 0,5 ml DMSO/H₂O i.p. injiziert. 5 h nach Applikation wurde Chromatin nach Sonnenbichler und Bornkamm (1967) isoliert.

Anschließend folgte eine Dichtegradientenzentrifugation in 2 M CsCl und 5 M Harnstoff, wobei pro 5 ml Gradient ca. 10 mg DNA aufgetragen wurde (Sonnenbichler et al. 1977). Nach einer Zentrifugation von 70 h bei 200000 x g wurden die Gradienten durch Anstechen mit einer Kanüle von unten fraktioniert und von jeder Probe E_{2,0} und spez. Radioaktivität bestimmt.

2.3 Durchführung einer Teilhepatektomie nach Higgins und Anderson (1931)

Bei allen Versuchen wurden spezifisch pathogenfreie weibliche GSF-Wistarratten (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung) verwendet, die stets zwischen 95 - 105 g wogen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 ± 5 % gehalten und erhielten Futter (Altromin 1324) und Wasser nach Belieben. Durch eine automatische Schaltuhr war ein 12stündiger Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit gewährleistet. Die Tiere wurden immer zwischen 9⁰⁰ und 10⁰⁰ Uhr am Vormittag getötet und dementsprechend wurde der Zeitpunkt der Teilhepatektomie und der Injektionen kalkuliert. Die Ratten wurden mit Ether narkotisiert und auch während der Operation ständig, jedoch vorsichtig unter Ether gehalten. Der Bauch wurde rasiert, mit 70 % Ethanol abgewaschen und mit Merfen

Orange desinfiziert. Nach Öffnen der Bauchdecke wurden die linken und rechten Hautschichten mit Seide nach oben gebunden, dann die zwei feinen Hautchen der Leber mit der Schere abgetrennt. Anschließend wurde die Leber hinter den zwei vorderen großen Lappen mit Catgut abgebunden und verknotet; daraufhin wurden die beiden großen Lappen mit der Schere entfernt. Dies entspricht einer Resektion von 68 %. Der Bauchraum wurde etwas ausgetupft, dann zunächst das Bauchfell mit Seide zugenäht, anschließend die Oberhaut.

2.4 Zellkulturen

2.4.1 Burkitt-Lymphoma-Zellen, Linie Raji

Raji-Zellen wurden in Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % foetalem Kalberserum in liegenden Falcon-Kulturflaschen ohne Schütteln bei 37° C kultiviert. Die Gefäße waren luftdicht verschlossen und das Verhältnis Suspension-Luft betrug 1:4. Wenn die Zellsuspension (nach ca. 5 bis spätestens 7 Tagen) eine gelbe Farbe erreicht hatte, wurde sie halbiert und die gleiche Menge frisches Medium ergänzt. Nach dem Umsetzen sollte die Anfangskonzentration der Zellen nicht unter 2×10^5 Zellen/ml betragen; nach ca. 4 Tagen haben die Zellen eine exponentielle Wachstumsphase durchlaufen, wobei die Zellzahl auf ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen anstieg. Die Vitalität der Raji-Zellen wurde durch Trypanblaufärbung geprüft (0,6 % Trypanblau in 0,9 % NaCl). Die Wachstumskurven wurden durch Zählen eines Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer zu den jeweils angegebenen Zeiten aufgestellt. Bei allen Zellkulturen wurden während der logarithmischen Wachstumsphase die jeweils erforderlichen Mengen Zellsuspension unter sterilen Bedingungen zusammengegeben, dann ^3H -Thymidin zugesetzt, portioniert und variierende Mengen SIHS zugegeben. Somit war gewährleistet, daß in allen

Zellkulturen die gleiche Ausgangskonzentration an Zellen und eingesetzter Radioaktivität vorlag. Nach unterschiedlich langer Inkubation wurde die DNA wie unter 2.1.9 beschrieben isoliert.

2.4.2 HeLa-Zellen und menschliche Hepatomzellen der Zelllinie Alexander

Zur Kultivierung wurde dasselbe Medium mit den gleichen Zusätzen wie bei Raji Zellen verwendet. Bei einer Ausgangskonzentration von ca. 6×10^4 Zellen/ml wuchsen HeLa-Zellen bzw. Alexanderzellen innerhalb von 3 Tagen auf eine Zellkonzentration von ca. 30×10^4 Zellen. Da sie am Boden der Kulturflaschen festwachsen, müssen sie zum Ernten trypsinisiert werden. Dazu wurde die kombinierte Trypsin-Versen-Methode (Bonin, 1973) angewandt:

Zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium aus den Kulturflaschen abgekippt, die Zellen wurden 2 x mit der Trypsin-Versen-Lösung unter leichtem Schwenken gewaschen, die Lösung jeweils abgegossen; dann wurden die Kulturflaschen ca. 5 min bei 37°C in den Trockenschrank gelegt, bis sich die Zellen von der Wand lösten, erneut Medium dazugegeben und portioniert.

Die sterilfiltrierte Trypsin-Versen-Lösung hatte folgende Endkonzentrationen: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,02 % KH_2PO_4 , 0,115 % Na_2HPO_4 , 0,01 % Versen (=Titriplex III), 0,0625 % Trypsin (1:250), pH 7,2, als Indikator 0,04 % Phenolrot. Die Salzkonzentrationen dieser Lösung entsprachen der PBS-Lösung A (nach Dulbecco, 1954): d.h. wichtig war, daß kein Ca^{++} und kein Mg^{++} enthalten war.

2.4.3 Zajdela-Ascites-Hepatom-Zellen

Diese Hepatomzellen gewinnt man dadurch, daß Ratten mit jeweils 0,5 ml eingefrorener Zellsuspension i.p. gespritzt werden. Diese Zelllinie wächst im Bauchraum in Form von Ascitesflüssigkeit innerhalb von 4 - 6 Tagen, kann nach Entnahme aus dem Bauchraum wie die Burkitt-Lymphoma-Zellen

der Zelllinie Raji über einige Tage in Kultur gehalten und in gleicher Weise getestet werden.

2.4.4 Isolierung und Inkubation von Hepatozyten

Die Leberzellen wurden nach einer modifizierten Methode von Seglen (1973) präpariert: Der Ratte, die durch Athernarkose ruhiggestellt war, wurde i.p. Narcoren 0.03 ml/100 g Körpergewicht und zugleich Heparin (500 I.E./100 g) gespritzt. Für die chirurgischen Operationen ist Sterilität aller Gefäße, Pipetten, Bestecke und sonstiger Hilfsmittel Voraussetzung (Greene, 1935). Die Glasgefäße, mit denen die Hepatozyten in Berührung kommen, wurden silikonisiert. Als Arbeitsplatz diente eine sterile Werkbank. Nach Öffnung des Bauchraumes wurde die Vena cava inferior abgeklemmt, in die Vena portae eine Kanüle eingeführt und die Aorta dorsalis durchtrennt (Wagle u. Ingebretsen, 1973). über die Vena portae wurde dann Ca^{2+} -freie Hank's-Lösung (Perry et al. 1972) (etwa 5 ml/min) in die Leber gepumpt. Die Hank's-Lösung war auf 37° C erwärmt, O_2 -gesättigt und enthielt 100 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin G. Die Lösung wurde solange (ca. 2 min) in die Leber gepumpt, bis eine Schwellung sichtbar wurde. über die linke Herzvorkammer wurde dann eine weitere Kanüle in die Vena cava inferior eingeführt und die Perfusion bis zur vollständigen Blutleere der Leber weitergeführt. Während der Perfusion wurde die Leber vom umgebenden Bindegewebe befreit und auf ein, mit einem Gitter abgedecktes, Becherglas transferiert. In dem Becherglas befand sich die "Enzymperfu-sionslösung" bestehend aus 30 mg Kollagenase II (IUB Nr. 3.4.4.19) in 45 ml Ca^{2+} -freier Hank's-Lösung (Howard u. Pesch, 1968). Die Lösung war wie oben mit O_2 gesättigt, auf 37° C erwärmt und enthielt die erwähnten Antibiotica. Diese Lösung wurde dann 20 min lang (10 ml/min) durch die Vena portae in die Leber gepumpt. Anschließend wurde das Lebergewebe durch Einstechen der Kanüle an verschiedenen Stellen bei laufender Pumpe aufgelockert. Die interzelluläre

Matrix war nun soweit aufgelöst, daß die Leber durch Schwenken in Kollagenase-Lösung zu einer Zellsuspension zerfiel. Diese wurde durch vier Lagen Gaze gefiltert und einmal bei 500 Upm = 80 x g, 2 min abzentrifugiert. Man wusch noch einmal mit eiskalter Ca^{2+} -haltiger (normaler) Hank's-Lösung (Rerabec, 1960). Im Zellpellet befanden sich etwa 5×10^7 parenchymatische Leberzellen pro 1 g Leber. 10 μl Pellet, 1:100 mit Medium oder physiologischer Kochsalz-Lösung verdünnt, wurden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Auch ungefarbt konnte schon zwischen intakten Zellen, die eine gelbliche Farbe und wohldefinierten Umriss besitzen und beschädigten Zellen, die flach, milchig und erdfarben sind und faserige Ränder aufweisen, unterschieden werden.

Die Anzahl intakter Zellen wurde durch Trypanblaufärbung gemessen (Howard u. Pesch, 1968). Dafür wurden 100 μl Zellsuspension mit 300 μl isotonischer, 0.6 % Trypanblau-Lösung (150 mg Trypanblau und 120 mg NaCl in 25 ml H_2O bidest.) angefarbt (Farbekonzentration 0.45 %). Die so behandelte Suspension ließ man in die Neubauerzählkammer einlaufen (Seglen, 1973). Im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung konnten die blau angefarbten beschädigten Zellen gut von den farblosen intakten unterschieden und ausgezählt werden.

Die oben angeführte Methode ergab Ausbeuten vitaler Hepatozyten von 90 - 95 %. Anschließend wurden die Zellen in Medium 199 in einer Konzentration von ca. 5×10^5 Zellen/ml in Falcon-Plasticulture-flasks in feuchter Atmosphäre bei 37 ° C kultiviert (Morgan et al., 1950). Auf die Zugabe von fetalem Kalberserum wurde verzichtet, dafür aber 2 mM Glutamin und 0.35 g NaHCO_3 /l zugesetzt (Waymouth, 1953).

2.5 Jodierung von Silibinin

1 mmol Silibinin (= 482 mg) wurde in 10 ml 96 % Ethanol unter Erhitzen im Wasserbad gelöst. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte zuerst die Zugabe von 1.2mmol KJ (= 199,2 mg), das in 1 ml Wasser gelöst war und dann von 1.2mmol H_2O_2 (136 μl 30 % H_2O_2). Das Reaktionsgemisch wurde 1 1/2 h bei Raumtemperatur stehengelassen, wobei sich die Farbe von gelbbraun nach braunlila änderte und ein Niederschlag entstand.

Nach Zugabe von 2.2 mmol HCl (= 440 μl 5N HCl) wurde die Lösung am Rotationsverdampfer einrotiert. Der Niederschlag wurde zweimal in je 5 ml Essigsäureethylester gelöst, filtriert, erneut einrotiert und über Nacht im Exsiccator getrocknet.

Zur Auftrennung wurden die entstandenen Substanzen auf Kieselgel 60_{F254} DC-Platten in Essigsäureethylester chromatographiert. Es zeigte sich, daß ein Gemisch aus 3 Substanzen vorlag: quantitativ den größten Anteil (ca. 50 %) bildete das Monojodderivat ($R_f = 0,53$), das mit etwas unsubstituiertem Silibinin ($R_f = 0,57$) und ca. 30 % Dijodderivat ($R_f = 0,29$) verunreinigt war. Die Substanzen wurden mit Essigsäureethylester eluiert.

Zur weiteren Reinigung wurde eine HPLC-Chromatographie an einer reversed-phase Saule RP 18 in 50 % Acetonitril / 50 % H_2O unter Zusatz von 0,5 % Essigsäure durchgeführt (Retentionszeiten siehe S. 77).

Die Strukturzuordnung erfolgte mittels Massen-, NMR- und UV-spektroskopischen Analysen (siehe Anhang).

Das 8-Jodsilibinin wurde in einer Ausbeute von 190 mg (40 %) erhalten. Bereits beim Erhitzen auf 60° lagert sich das Jodatome in die Stellung C-6 um.

Zersetzungspunkt: 168° - 170°.

UV-Spektrum von 8-Jodsilibinin:

λ_{max} (ϵ) in Ethanol: 334 nm (12160), 287 nm (17328), 205 nm (115155).

Massenspektren:

Die Massenspektren wurden an einem Massenspektrometer CH7A der Fa. Varian MAT gemessen (siehe S. 78).

NMR-Spektren:

Die NMR-Messungen wurden an einem AM500 NMR-Spektrometer der Fa. Bruker durchgeführt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Untersuchungen zur Beeinflussung der RNA-Synthese durch Silibinin in vivo

Fruhere Untersuchungen hatten zwar grundsätzlich eine Stimulierung der RNA-Synthese durch Silibinin in Hepatozytenkulturen und einigen in vitro-Transkriptionssystemen gezeigt, es fehlte jedoch die Bestätigung der Wirkung in vivo. Dies erschien besonders interessant, da Silibinin therapeutisch eingesetzt wird, und da in vitro Befunde nicht unbedingt auf die in vivo Situation übertragbar sind. In einem Gesamtorganismus spielen zusätzliche Einflüsse eine Rolle, wie z.B. die Frage der Resorption, des Transportes, der Metabolisierung usw.

Weitere wichtige Fragestellungen diesbezüglich betrafen den Zeitverlauf der Silibininwirkung in vivo, die Dosisabhängigkeit in vivo und die Wirkdauer von Silibinin.

Für alle in vivo-Versuche wurden spezifisch pathogenfreie Wistarratten verwendet. Als Vorläufer für das in RNA einzubauende Uridin wurde ^{14}C -Orotsäure i.p. appliziert. Nach unterschiedlich langen Einwirkzeiten des Silibinins bzw. der Radioaktivität wurden die Lebern entnommen, die RNA daraus isoliert und als Maß für die RNA-Synthesegeschwindigkeit die spezifische Radioaktivität der RNA bestimmt. Da der Stoffwechsel bei Ratten tageszeitlich unterschiedlich abläuft (La Brecque, 1978), wurde soweit irgend möglich der circadiane Rhythmus der Tiere bei den Versuchen berücksichtigt. Alle Tiere unterlagen dem gleichen Tag-Nacht-Rhythmus und wurden zum gleichen Zeitpunkt getötet.

1.1 Steigerung der RNA-Synthese unter dem Einfluß von Silibinin in vivo

Das Flavonolignan Silibinin wurde aus Gründen der besseren Wasserlöslichkeit als Hemisuccinat (= SIHS), welches durch die Leberesterasen innerhalb 30 min vollständig hydrolysiert wird (Koch und Tscherny, 1983), in 0.9% NaCl-Lösung i.p. appliziert.

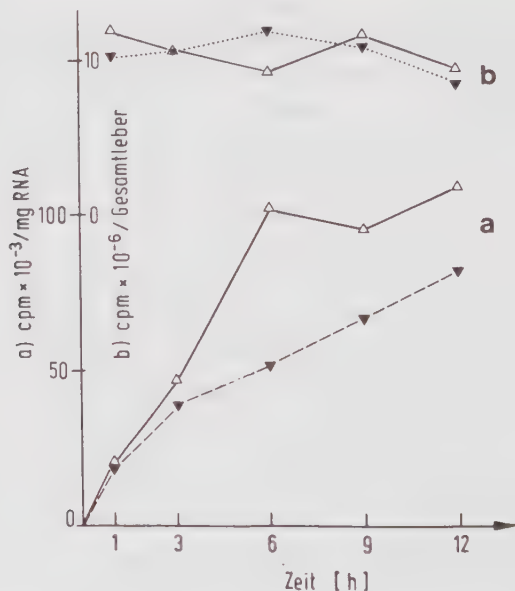


Abb. 1 Stimulierung der RNA-Synthese in Rattenlebern
 a) Spezifische Radioaktivität der Gesamt-RNA aus Lebern nach unterschiedlich langer Markierung mit $25\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Orotsäure pro Tier und nach i.p. Injektion von SIHS 12 h vor der RNA-Isolierung.
 b) Gesamte Radioaktivität in den Lebern (Precursorkonzentrationen)
 $\triangle$ — $\triangle$ mit Silibinin behandelt
 $\blacktriangledown$ --- $\blacktriangledown$ Kontrollen

Entsprechende Kontrolltiere erhielten nur physiol. Kochsalzlosung. Die Versuchsreihe zu Abb. 1 wurde so angelegt, daß den Tieren 12 h vor dem Toden jeweils 3mg SIHS und 1-12 h vorher die Radioaktivität injiziert wurde.

Jeweils 1 g Leber wurde homogenisiert und nach Brossard und Nicole (1968) phenolisiert. Nach der Phenolextraktion wurden die Nukleinsäuren mit Alkohol präzipitiert, die RNA nach Mejbaum (1939) bestimmt und die spezifische Radioaktivität berechnet. Der zeitliche Verlauf des Uridineinbaus in RNA der Leber ohne und unter dem Einfluß von Silibinin ist in Abb. 1a dargestellt. Mehrfache Wiederholung des Experiments - auch mit unterschiedlichen Mengen an radioaktiven Vorstufen - ergab stets einen ähnlichen Kurvenverlauf: Ca. 6 h nach Gabe der radioaktiven Vorstufe findet man nahezu eine Verdopplung des Uridineinbaus in die RNA der Leberzellen. Nach 12 h flacht der Effekt zunehmend ab.

Aus diesem Experiment wird erkennbar, daß Silibinin auch in vivo einen aktivierenden Einfluß auf die RNA-Synthese in Rattenlebern ausübt. Für die nachfolgenden Versuche war die Kenntnis des Zeitverlaufs der Stimulierung im Gesamtorganismus von Bedeutung.

Sehr wichtig bei diesem Experiment war es, die Möglichkeit auszuschließen, daß durch Silibinin die Precursorkonzentrationen in der Leberzelle erhöht werden und radioaktives Uridin dadurch vermehrt eingebaut wird. Um dies abzuklären, wurde sowohl von Kontrolltieren als auch von Silibinin behandelten Ratten Lebergewebe in Protosol und H_2O_2 aufgelöst und die vorhandene Gesamtradioaktivität pro Leber bestimmt. Wie man aus Abb. 1b sehen kann, sind nach 6 h nur etwa 1 % der insgesamt vorhandenen Radioaktivität in RNA eingebaut. Der erhöhte Uridineinbau in die RNA der mit Silibinin behandelten Tiere darf nicht auf ein größeres Precursorangebot in den Leberzellen zurückgeführt werden. Im Gegenteil, bei dem 6 h Wert, bei dem für die RNA der größte Unterschied zwischen Kontrolle und Silibinin besteht, zeigt

die Kontrolleber eher eine höhere Gesamtaktivität im Vergleich zur Gesamtaktivität der mit Silibinin behandelten Leber. Trotzdem ist der Einbau an radioaktivem Uridin in die RNA bei der mit Silibinin behandelten Ratte fast doppelt so hoch.

1.2 Dosisabhängigkeit der RNA-Synthesesteigerung

In folgenden Versuchsreihen zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit wurde 10 h nach i.p. Injektion von unterschiedlichen Mengen SIHS und 8 h nach Gabe von ^{14}C -Orotsäure an die Ratten die Leber-RNA isoliert und ihre spez. Aktivität bestimmt. Der RNA-Synthese steigernde Dosisbereich des Silibinins liegt zwischen 1-10 mg/100 g Körpergewicht.

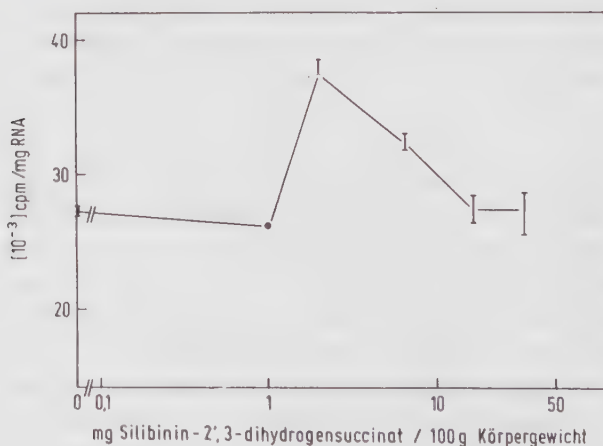


Abb. 2 Dosisabhängigkeit der Silibininwirkung
Spez. Radioaktivität der RNA aus Rattenlebern 10 h nach Gabe von unterschiedlichen Silibininmengen und 8 h nach Markierung mit 10 μCi ^{14}C -Orotsäure. Mittelwerte aus je 4 Tieren.

1.3 Dauer des Silibinineffektes auf die RNA-Synthese in der Rattenleber

Den prozentual größten Unterschied in der spezifischen Markierung der ohne und nach Silibiningabe synthetisierten RNAs findet man 6-9 h nach ^{14}C -Orotsäureinjektion. Um die Dauer der Wirkung des Flavonolignanderivates zu testen, wurden Ratten zuerst unterschiedlich lange mit SIHS vorbehandelt, dann wurde jeweils 7 h vor der Entnahme der Lebern ^{14}C -Orotsäure i.p. injiziert.

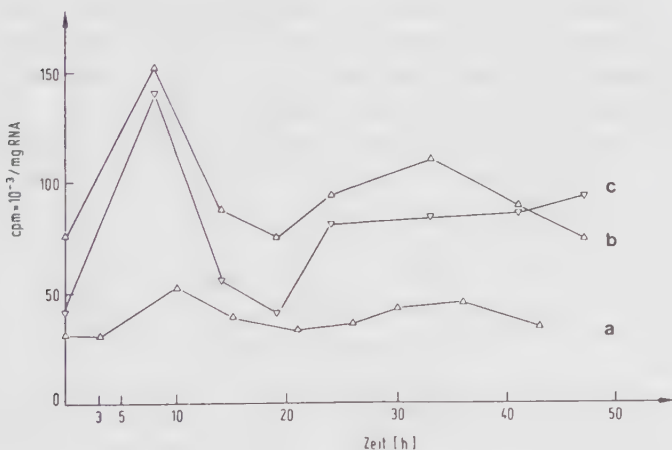


Abb. 3 Zeitabhängigkeit der Silibininwirkung
Spezifische Radioaktivität der RNA aus Rattenlebern nach unterschiedlich langer Vorbehandlung der Tiere mit Silibinin und einer konstanten Pulsmarkierung mit jeweils $25\mu\text{Ci}$ ^{14}C -Orotsäure
a) Kern-RNA jeweils 2 h nach Orotsäuregabe;
b) Kern-RNA und c) cytoplasmatische RNA nach jeweils 7 stündiger Markierung.

In einer parallelen Versuchsreihe wurde erst 2 h vor dem Töten der Tiere der radioaktive Vorläufer i.p. appliziert, um den zeitlichen Verlauf der Silibininwirkung auch bei anderen Markierungsbedingungen zu verfolgen.

Wie im vorhergehenden Abschnitt wurde auch hier die gleichmäßige Resorption der radioaktiven Vorstufe bei den Versuchstieren kontrolliert.

Aus den Leberhomogenaten wurden Kern und Cytoplasma RNA nach Brossard und Nicole (1968) bzw. nach Penman (1966) isoliert und die spezifischen Radioaktivitäten bestimmt.

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Einfluß von Silibinin auf den Uridineinbau in RNA nach einem 7 h und nach einem 2 h Puls von Orotsäure. Bei beiden Versuchsreihen findet man ein erstes Maximum der Stimulierung 8-10 h nach Gabe des Flavonolignans, dann bei ca. 18 h ein fast völliges Verschwinden des Effekts mit nachfolgend erneuter Anhebung der RNA-Synthese bis ca. 36 h nach Applikation.

1.4 Analyse der unter dem Einfluß von Silibinin beschleunigt synthetisierten RNA-Typen

Durch die unter 1.1. bis 1.3. beschriebenen Versuchsreihen konnte die Stimulierung der RNA-Synthese in vivo deutlich gezeigt werden. Zur Abklärung der Frage, ob ein bestimmter RNA-Typ bevorzugt schneller gebildet wird, war eine detaillierte Analyse des Effekts auf die Synthese der rRNA, m-RNA und t-RNA-Spezies notwendig. Da in vitro die Transkription durch die DNA abhängige RNA Polymerase I stimuliert wird, lag die Vermutung nahe, daß dies auch in vivo der Fall sein konnte. Dies galt es abzuklären.

Zunächst wurde die RNA in vivo radioaktiv markiert.

In 120g schwere Wistarratten wurden 12 h vor Isolierung der RNA je 3mg SIHS i.p. injiziert, in Kontrolltiere entsprechend nur physiologische Kochsalzlosung. 12, 6 und 3 h vor dem Toden erhielten die Tiere je 25 μCi ^{14}C -Orotsäure. Die gesamte Leber RNA wurde nach Brossard und Nicole (1968) isoliert.

Zur Charakterisierung der einzelnen RNA-Typen sind Fraktionierungen der Gesamt-RNA notwendig, die durch verschiedene Methoden erreicht wurden:

- a) Sucroседichtegradientenzentrifugation
- b) verschiedene Elektrophoreseverfahren
- c) Affinitätschromatographie

1.4.1 Auftrennung der in vivo markierten Gesamt-RNA durch Ultrazentrifugation in Sucrosegredienten

Jeweils 20 E_{260} -Einheiten der in vivo markierten Gesamt-RNA von Kontrolltieren und mit Silibinin behandelten Tieren wurden in Dichtegradienten mit 15 - 30 % Sucrose bei 70000 xg zentrifugiert und anschließend fraktioniert. In Abb. 4a-f ist der Verlauf der optischen Dichte und der Radioaktivität dargestellt. Hauptanteile bilden wie zu

erwarten die 5-6 S, 18 S und 28 S RNAs (Bandung kontrolliert durch ^{32}P markierte Marker-RNAs). Die spezifische Radioaktivität der ribosomalen RNAs aus den mit Silibinin behandelten Ratten ist wieder deutlich erhöht: zuerst im Bereich der 5 S RNA, dann nach 12 h deutlich auch bei der 28 S RNA. Darüber hinaus ist nach 6 h Markierung im Vergleich zu den Kontrollen ein stets reproduzierbarer und deutlicher Unterschied im RNA-Muster des hochmolekularen Bereichs zu erkennen, Abb. 4c/d. Dieser Unterschied wird

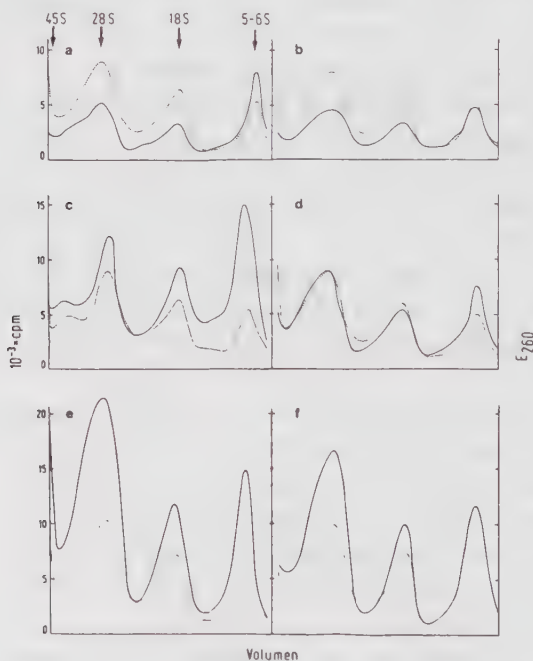


Abb. 4a-f Verlauf der E260 (----) und der Radioaktivität (—) nach Auftrennung gleicher Mengen Gesamt-RNA aus Lebern in Succrosegradienten (15-30%, 16 h, 70000 $\times g$). Die RNA wurde aus Ratten ohne (b,d,f) und nach (a,c,e) Vorbehandlung mit Silibinin bei unterschiedlich langer Markierung mit ^{14}C -Orotsäure (a,b 3 h; c,d 6 h; e,f 12 h) isoliert.

noch deutlicher, wenn 5 h nach Vorbehandlung mit Silibinin nur 60 min mit je 50 μCi Orotsäure markiert wird und dann nach Penman (1966) die Kern-RNA isoliert und in Sucrosegradienten analysiert wird, Abb. 5. Im Vergleich zu den Kontrollen sieht man im Muster der RNA aus den Silibinin behandelten Tieren eine starke Anreicherung der 45 S RNA, eine ribosomale Precursor-RNA. Man kann aus diesen ersten Befunden folgern, daß auch in vivo eine Stimulierung der ribosomalen RNA-Synthese durch Silibinin erfolgt.

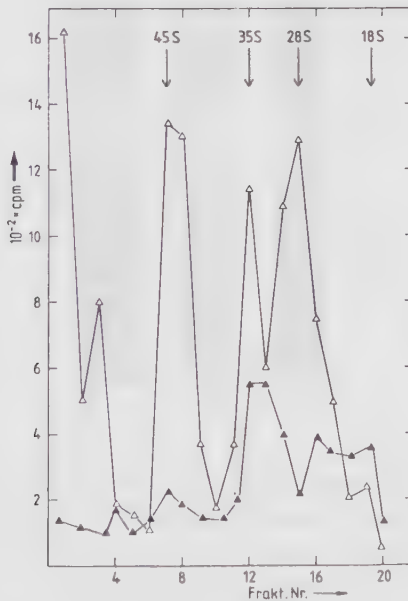


Abb. 5 Radioaktivitätsverteilung der Kern-RNA aus Rattenlebern nach Markierung mit je 50 μCi ^3H -Orotsäure, 60 min. Isolierung nach Penman (1966) und Auftrennung durch Sucrosegradientenzentrifugation (15–30%), 2 h, 190000xg.
 —△— Ratten 5 h mit Silibinin vorbehandelt
 —▲— Kontrolltier ohne Silibinin

1.4.2 Elektrophoretische Analyse der in vivo markierten Gesamt-RNA

Zur Absicherung des eben beschriebenen Befundes wurde als zweite Trennungsmethode eine Elektrophorese an 0,75 % Agarosegelen durchgeführt. Die Auftrennung jeweils gleicher Mengen Gesamt-RNA von Kontroll- und mit Silibinin behandelten Tieren ist in Abb. 6 dargestellt.

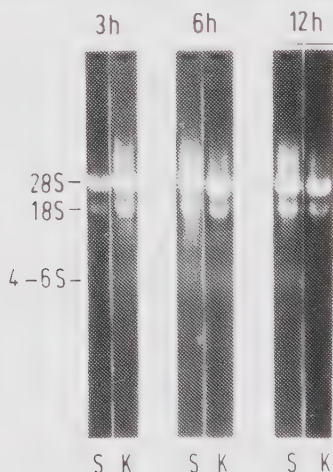


Abb. 6 Elektrophoretische Auftrennung der Leber-RNAs in 0,75 % Agarosegel (17 h, 1,5 V/cm) nach Färbung mit Ethidiumbromid und Photographie unter UV-Bestrahlung. Die RNA wurde vorher aus Ratten isoliert, die je 12 h mit (S) und ohne Silibinin (K) vorbehandelt wurden und 3, bzw. 6, bzw. 12 h vor dem Toden je 25 μCi ^{14}C -Orotsäure injiziert erhielten.

In Abb. 7 a-f ist die densitometrische Auswertung und die Verteilung der Radioaktivität in den Gelen aufgetragen.

Wieder erkennt man die schnellere Markierung der rRNA aus den Lebern der mit Silibinin vorbehandelten Tiere und den deutlich höheren Anteil an hochmolekularen RNA-Vorstufen (45 S).

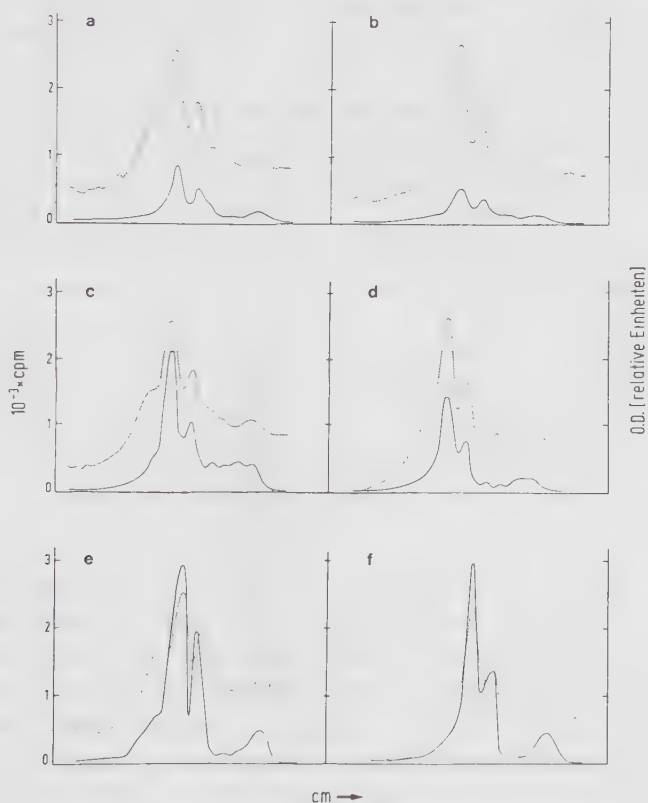


Abb. 7a-f Densitogramme der Gele von Abb. 6 (----) und Verlauf der Radioaktivität (—). RNA aus Ratten ohne (b,d,f) und nach Vorbehandlung (a,c,e) mit Silibinin und nach unterschiedlich langer Markierung mit ^{14}C -Orotsäure (a,b 3 h; e,d 6 h; e,f 12 h).

Nach Isolierung der fraktionierten RNA-Typen wurden die spezifischen Radioaktivitäten gemessen. Sie sind in nachstehender Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 1 Spezifische Radioaktivitäten [cpm/mg] der ribosomalen 18 S und 28 S-RNA aus Silibinin behandelten Ratten und Kontrollen.

In Klammern die Mengenanteile (E_{260}) bezogen auf eingesetzte Gesamt-RNA.

	Gesamt-RNA	28S RNA (43%)	18S RNA (23%)
Silibinin behandelt	138000	83250	74000
Kontrollen	69700	64750	42310

Die spezifische Radioaktivität der Gesamt-RNA ist bei den mit Silibinin behandelten Tieren mit 138800 cpm/mg RNA gegenüber den Kontrollen mit 69700 cpm/mg RNA etwa verdoppelt. Dieses Verhältnis bleibt für die 28S und 18S RNA nicht mehr genauso hoch erhalten, bedingt aller Wahrscheinlichkeit nach durch das Processing, dem die 45S RNA Vorstufe, die bei der Gesamt-RNA mit erfaßt wird, unterliegt.

1.4.3 Analyse der 5,8S-, 5S- und t-RNA unter dem Einfluß von Silibinin

Die Analyse der RNA in Sucrosegradienten und durch Elektrophorese an 0,75 % Agarosegelen erlaubt keine detaillierte Aussage über die Markierungsraten der kleinen

t-RNAs, der 5 und 5.8 S RNA. Um dies zu untersuchen, wurden in mit Silibinin behandelten und unbehandelten Ratten 6 h vor Entnahme der Lebern je 100 μCi ^{14}C -Orotsäure i.v. in die Schwanzvene injiziert, bei den Silibinin behandelten Ratten gleichzeitig 1,5 mg SIHS. Dann wurde die cytoplasmatische RNA nach Loening (1967) isoliert. Die gereinigten RNAs wurden nach Blatt und Feldmann (1973) auf 40 cm langen 10 % Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, Abb. 8, wobei stets gleiche Mengen an RNA der Kontrolltiere und der mit Silibinin behandelten Tiere aufgetragen wurden.

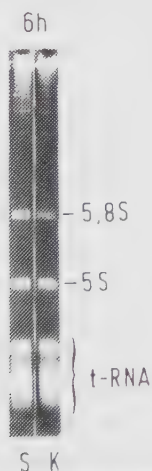


Abb. 8 Elektrophoretische Auftrennung der "kleinen RNAs" auf 10 % Polyacrylamidgelen. RNA 6 h vorher mit ^{14}C -Orotsäure markiert, (S) gleichzeitig 1,5 mg SIHS/100g Körpergewicht (K) Kontrolle

Nach Elution der t-RNAs, 5S und 5,8S-RNAs aus den entsprechenden Gelabschnitten wurde die RNA durch Messung der E_{260} und nach Mejbaum (1939) bestimmt und die spezifischen Radioaktivitäten errechnet, Tab. 2.

Tab. 2 Spezifische Aktivitäten (cpm/mg) der cytoplasmatischen RNA und der daraus abgetrennten "kleinen RNAs" aus Lebern von Silibinin behandelten und unbehandelten Ratten. In Klammern Mengenanteile (E_{260}) bezogen auf eingesetzte Gesamt-RNA.

	Cytoplasma RNA gesamt	tRNA	5 S RNA	5.8 S RNA
Silibinin behandelt	282000	(7.2%) 105560	(1.3%) 91220	(1.1%) 67230
Kontrolltier	223000	(7.3%) 104260	(1.5%) 89050	(1.2%) 50410

Die Daten der Tab. 2 zeigen, daß bei den t-RNAs, die etwa 7,3% der Gesamt-RNA ausmachen, keine signifikanten Unterschiede in der Markierungsrate beobachtbar sind; ähnlich verhält es sich mit der 5 S RNA. In der Zeiteinheit deutlich schneller (33 %) markiert wird dagegen die 5.8 S RNA. Dieses Ergebnis war ausgesprochen erfreulich, denn nur die 5,8S RNA ist wie die 18S und 28S-RNA ein Folgeprodukt der gemeinsamen 45S ribosomalen Vorläufer RNA, die von der Polymerase I in den Nucleolen synthetisiert wird, während die 5S-RNA und die t-RNAs von der Polymerase III synthetisiert werden.

1.4.4 m-RNA Synthese und Silibinin

Nur etwa 5% der RNA in Leberzellen gehören zur Klasse der m-RNAs, die zum überwiegenden Teil am 3'Ende poly-A Ketten tragen. Das übliche Verfahren zur Abtrennung von mRNAs bietet deshalb die Affinitätschromatographie über Oligo-(dT)-Cellulose.

Durch i.v. Injektion von je 100 μCi ^{14}C -Orotsäure bei gleichzeitiger Gabe von 1,5 mg SIHS (bzw. physiol. Kochsalzlosung beim Kontrolltier) 6 h vor der Leberentnahme wurde die RNA relativ hoch markiert. Die cytoplasmatische RNA wurde nach Loening (1967) und die Kern-RNA nach Penman (1966) isoliert und an Oligo-(dT)-Säulen chromatographiert. Gemessen wurden wieder die spezifischen Aktivitäten, Tab. 3.

Tab. 3 Spezifische Aktivitäten cpm/mg der Gesamt RNA und daraus isolierter mRNAs aus Lebern von Silibinin behandelten und unbehandelten Ratten. In Klammern Mengenteile (E_{260}) bezogen auf eingesetzte Gesamt-RNA.

	Cytoplasma RNA Gesamt	Kern RNA Gesamt	mRNA Cytoplasma	mRNA Kerne
Silibinin behandelt	282000	626000	(1.3%) 908900	(2%) 68500
Kontrolltiere	223000	402200	(1.3%) 1042000	(0.7%) 73900

Aus Tab. 3 wird ersichtlich, daß man wie vorausgehend beschrieben, deutliche Unterschiede in der spez. Markierung der Gesamt-RNA erkennt: 27% höhere Einbauraten bei der unter Silibininwirkung synthetisierten Cytoplasma RNA, 55% höhere

bei der Kern-RNA. Diese Unterschiede fehlen bei den m-RNAs, die mit Ausbeuten zwischen 0,7 - 2% der Gesamt-RNA abgetrennt werden konnten. Im gezeigten Beispiel ist umgekehrt die mRNA der Kontrolltiere sogar geringfügig höher markiert.

Die Syntheserate der mRNAs in ihrer Gesamtheit wird also durch Silibinin nicht nachweisbar verändert.

1.5 Einfluß des Silibinin auf die in Ribosomen eingebauten rRNAs und die Ribosomensynthese

Aus der vorausgehend beschriebenen Analyse der unter dem Einfluß von Silibinin vermehrt gebildeten RNA-Typen geht hervor, daß nur die 5,8S, 18S und 28S-RNA-Synthese beschleunigt abläuft. Daraus erhebt sich die Frage, ob diese gesteigerte rRNA-Produktion auch zu einer vermehrten Ribosomenbildung führt.

Der Prozeß der Ribosomensynthese beginnt im Nucleolus mit der Transkription der 45S-Precursor-RNA, die dann über eine Reihe von Schritten zur 5,8S, 18S und 28S-RNA gespalten wird. Schon während dieses RNA-Processing beginnt die Komplexierung mit den ribosomalen Proteinen und der nicht nucleolaren 5S-RNA, so daß aus dem Nucleolus weitgehend die fertigen ribosomalen Untereinheiten in das Cytoplasma entlassen werden (Mainwaring et al. 1982).

1.5.1 Zeitverlauf der rRNA-Markierung in Ribosomen

In einer ersten Versuchsreihe wurde in eine Gruppe von Ratten 6 h vor Gabe von ^3H -Orotsäure 2 mg des Flavonolignans intraperitoneal injiziert. Entsprechende Kontrolltiere erhielten nur physiolog. Kochsalzlösung und ^3H -Orotsäure. Die Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeiten (1-10 h) getötet und aus den Lebern die Ribosomen nach Chandra (1973) und Poulson (1973) isoliert und gereinigt. Die zeitliche

Zunahme der spezifischen Radioaktivität der Ribosomen-RNA ist bei Silibinin behandelten und den Kontrolltieren in Abb. 9 dargestellt. Bereits nach 2 h ist der erhöhte Einbau des radioaktiven Precursors in die Ribosomen der mit Silibinin behandelten Tiere deutlich erkennbar.

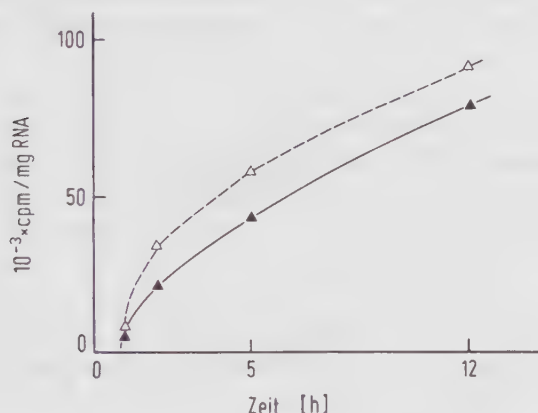


Abb. 9 Zeitabhängige Zunahme der spezif. Radioaktivität der RNA in gereinigten Ribosomen nach Markierung durch i.p. Injektion von je $25\mu\text{Ci } ^3\text{H-Orotsäure}$ ohne (▲) und unter dem Einfluß von Silibinin (Δ) (6 h vor dem Zeitpunkt 0 wurden 2 mg SIHS/100g Körpergewicht gegeben).

1.5.2 Zeitlicher Verlauf der Silibininwirkung

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 150g schwere Ratten unterschiedlich lange Zeiten mit 1.5mg SIHS vorbehandelt und jeweils 3 h vor der Entnahme der Lebern $^{14}\text{C-Orotsäure}$ i.p. injiziert. Nach Isolierung und Reinigung der Ribosomen wurden die spezifischen Radioaktivitäten der rRNA aus

Silibinin- und Kontrolltieren bestimmt. Die Quotienten der einander entsprechenden spezif. Radioaktivitäten sind in Abb. 10 in Abhängigkeit von der Zeit der Silibininvorgabe aufgetragen. Auch hier ist der erhöhte Einbau von ^{14}C -Uridin in die Ribosomen bei den mit Silibinin behandelten Tieren erkennbar. Besonders nach 12 h und zwischen 35-45 h wird der Einfluß von Silibinin auf die Ribosomenmarkierung deutlich.

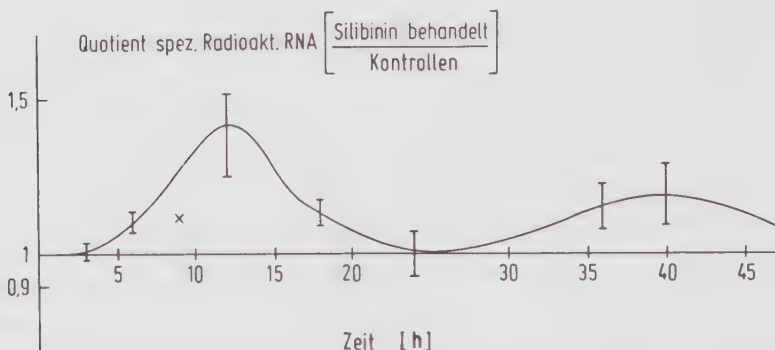


Abb. 10 Quotienten der spezif. Radioaktivität der Ribosomen-RNA (Silibinin behandelt / Kontrollen) nach jeweils 3 h Markierung mit je $25\mu\text{Ci}$ ^{14}C -Orotsäure in Abhängigkeit von der Zeit der Vorbehandlung der Ratten mit Silibinin (2 mg/100g Körpergewicht).

1.5.3 Ribosomale Proteine

Die erhöhte Radioaktivität der unter dem Einfluß von Silibinin gebildeten Ribosomen muß nicht zwingend eine beschleunigte Ribosomenproduktion anzeigen, sondern kann eine Folge der Inkorporation der, wie oben beschrieben, starker markierten rRNA-Bausteine sein. Eine eventuell

erhöhte Bildungsgeschwindigkeit von Ribosomen mußte aber nachweisbar werden durch die gleichzeitige Messung des Einbaus ribosomaler Proteine. Wurde die Bildungsgeschwindigkeit der Ribosomen durch das Flavonolignan nicht beeinflußt, so durften nach Markierung der ribosomalen Proteine mit ^{14}C -Isoleucin keine erhöhten ^{14}C -Radioaktivitätsmengen in den neugebildeten Ribosomen erscheinen, anders dagegen bei unterschiedlichen Syntheseraten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden deshalb 14 h vor der Ribosomenisolierung je 2 mg SIHS i.p. in Ratten injiziert. Die Kontrollen erhielten nur physiol. NaCl-Lösung. 3,5 bzw. 10 h vor dem Toden bekamen die Tiere je 50 μCi ^{14}C -Isoleucin. Die nachstehenden Zahlen zeigen die radioaktiven cpm bezogen auf je 20 E_{260} - (RNA)-Einheiten:

Tab. 4 Spezifische Radioaktivität der Ribosomen
cpm/mg RNA nach Markierung mit ^{14}C -Isoleucin
nach und ohne Silibininvorbehandlung

	Markierungs- zeit	Silibinin behandelt	Kontrollen	Quotient
a	10 h	11390	9770	1.17
b	3.5 h	15430	10570	1.46
c	3.5 h	14650	12000	1.22

Tab. 4 zeigt, daß bei den Silibinin behandelten Tieren der Einbau von ^{14}C -Ile pro Zeiteinheit stets erhöht ist.

Bei diesen Tieren ist also im Vergleich zu den Kontrollen der zeitliche Zuwachs an radioaktiver r-RNA, aber auch an markiertem ribosomalen Protein in den neugebildeten Ribosomen im Vergleich zum Gesamtpool der bereits vorhandenen "kalten" Ribosomen deutlich erhöht; d.h. die Ribosomensynthese läuft tatsächlich beschleunigt ab.

1.6 Zusammenfassende Diskussion zur Beeinflussung der RNA-Synthese in Rattenlebern durch Silibinin

Während von Sonnenbichler et al. (1976) und Machicao und Sonnenbichler (1977) durch in vitro Versuche ein Stimulierungseffekt des Flavonolignans Silibinin auf die RNA-Synthese schon grundsätzlich gezeigt worden war, fehlte die Bestätigung und quantitative Erfassung der Wirkung in vivo und vor allem die Analyse des Effekts auf die Synthese der unterschiedlichen RNA-Typen. Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten wurden durch in vivo Experimente an Wistarratten erhoben, wobei stets der circadiane Lebensrhythmus der Tiere bei der Versuchsdurchführung berücksichtigt wurde. Wegen der besseren Löslichkeit in wässrigem Milieu wurde Silibinin als Hemisuccinat appliziert. Wie Koch und Tscherny (1983) gezeigt haben, wird daraus durch die Esterasen der Leber das Silibinin schnell freigesetzt. Den Verlauf der zeitlichen Aufnahme des Flavonolignans in die Leberzellen nach i.p. Injektion haben Sonnenbichler et al. (1980) beschrieben.

Als Vorläufer für das in RNA einzubauende Uridin wurde ^{14}C -Orotsäure verwendet. Eine wesentliche Feststellung für die Interpretation aller beschriebenen Experimente ist der Befund, daß die Resorption des radioaktiven Vorläufers durch Silibinin nicht beeinflusst wird und daß die Precursorkonzentrationen in den Lebern der Versuchs- und Kontrolltiere praktisch gleich bleiben. Dies wurde zusätzlich in einer Reihe von Parallelversuchen, die hier nicht beschrieben wurden, abgesichert. Ca. 1-2% der Orotsäure werden in RNA eingebaut, vgl. Abb. 1. Aus den zugehörigen Synthesekurven für die RNA zeigt sich etwa 6 h nach Orotsäuregabe der Unterschied in der Geschwindigkeit der RNA-Synthese am deutlichsten, zu späteren Zeiten flacht er wieder ab. Bei der Diskussion der Kurven von Abb. 1 muß beachtet werden,

daß bei diesem Experiment nicht nur die Markierungsdauer, sondern gezwungenermaßen auch die Silibininvorgabe variiert. Die Abhängigkeit der Synthesebeeinflussung von der Zeit der Silibininapplikation ist aus Abb. 3 ersichtlich. Die Zunahme des Uridineinbaus mit der Zeit einerseits und der relativ kleine Silibinineffekt bei 12 h andererseits (Abb. 3) erklären die Abflachung der Kurve in Abb. 1 ab dem 9 h Wert recht zufriedenstellend.

Als wirksam erwiesen sich Dosierungen von 1-10 mg/100 g Körpergewicht, Abb. 2. Wie aus neueren, hier nicht dargestellten Befunden hervorgeht, wird bei höheren Silibininkonzentrationen die Permeabilität der Zellmembran für Orotsäure und Uridin herabgesetzt, so daß dann der geschilderten Synthesebeschleunigung ein Precursormangel gegenübersteht.

Soweit es die Dauer der Silibininwirkung auf die RNA-Synthese betrifft, Abb. 3, ist der biphasische Verlauf mit einem Maximum der Wirksamkeit nach 8 h und - nach Durchlaufen eines Minimums bei 18 h - mit einem zweiten Maximum bei 35 h bemerkenswert. Bereits bei konstanter 2-stündiger Markierung mit ^{14}C -Orotsäure (Abb. 3a) ist dieser Kurvenverlauf erkennbar, wird aber bei einer 7 h Markierung noch deutlicher. In gewisser Weise spiegelt sich darin mit einer Zeitverschiebung der Verlauf der Silibinin-konzentrationen im Zellkern nach Sonnenbichler et al. (1980). Den in Abb. 3 dargestellten biphasischen Verlauf der Silibininwirkung auf die gesamte Kern- und Cytoplasma RNA der Rattenlebern findet man darüber hinaus ähnlich für die RNA in gereinigten Ribosomen mit Maxima bei 12 und 40 h nach Gabe des Flavonolignans. Dies ist eine bemerkenswerte Korrelation.

Durch die elektrophoretische Analyse der unter Silibinineinfluß synthetisierten RNA (Abb. 6,7,8, Tab. 1,2,3) und durch die Daten aus der Analyse der Sucrosegradientenzentrifugationen (Abb. 4) konnte im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden, daß nur die ribosomalen RNAs von der Stimulation betroffen sind. Der Effekt erscheint zuerst deutlich im Bereich der 5-6 S RNA, später auch bei der 28 S RNA. Abb. 4c deutet bereits eine Vermehrung von hochmolekularen rRNA-Vorstufen an, was durch das in Abb. 5 dargestellte Versuchsergebnis unterstrichen wird. Die RNA-Synthese im Kern wird offensichtlich so beschleunigt, daß sich r-RNA-Precursor anhäufen.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der 5-6 S RNAs, (Abb. 8) und nach Vergleich ihrer spezifischen Markierung, Tab. 2, wird auch deutlich, daß weder die t-RNAs noch die 5 S RNA in ihrer Synthesegeschwindigkeit durch Silibinin beeinflusst wird. Ein deutlicher Effekt (33 %) ist nur bei der 5.8 S RNA festzustellen. Dies steht in bester Übereinstimmung mit dem Vorhergesagten. Im Gegensatz zur 5 S und tRNA, die durch die RNA-Polymerase III synthetisiert werden, ist die 5.8 S RNA ein Produkt der Polymerase I und entsteht neben 18 S und 28 S RNA aus dem gemeinsamen Vorläufer, der 45 S RNA. Die Annahme der erhöhten Bildungsgeschwindigkeit der ribosomalen 18 S und 28 S RNA unter dem Einfluß des Flavonolignans fordert zwingend den auch tatsächlich beobachtbaren Effekt auf die 5.8 S RNA.

Die Analysen der in vivo nach Gabe von Silibinin beschleunigt gebildeten RNA-Typen zeigen also klar einen stimulierenden Effekt des Flavonolignans auf die ribosomale RNA-Synthese. Dies korreliert mit den früheren in vitro Befunden von Machicao und Sonnenbichler (1977), wonach im Test mit RNA-Polymerase I die Transkriptionsaktivität ohne Änderung des meßbaren K_m -Werts erhöht wird. In der gleichen Arbeit wird auch berichtet, daß die Transkription mit Polymerase II nicht beeinflusst erscheint. Dies bestätigen in

vivo die Daten der Tab. 3, wonach Silibinin keinen erkennbaren Effekt hat auf die Synthesegeschwindigkeit der poly-A-tragenden m-RNAs.

Die Kurven der Abb. 9 und 10 in Verbindung mit den Werten aus Tab. 4 zeigen, daß als Folge der beschleunigten rRNA-Synthese auch schneller Ribosomen gebildet werden. Unter Silibinineinfluß wird sowohl mehr Uridin, wie auch mehr ^{14}C -Ile in die Bausteine dieser Ribonucleoproteidpartikel pro Zeiteinheit eingebaut und der Markierungsgrad der insgesamt isolierbaren Ribosomen nimmt nach Silibiningabe im Vergleich zu den Kontrollen deutlich zu. Wurde die Bildungsgeschwindigkeit der Ribosomen unverändert sein, hatte als Folge der höher markierten rRNAs zwar der eingebaute ^{14}C -Uridinanteil zugenommen, nicht aber der radioaktive Aminosäureanteil der ribosomalen Proteine.

Zur Bildung der Ribosomen wird auch die extranucleoläre 5 S RNA benötigt. Wie die Daten der Tab. 2 zeigen, scheint die Synthesegeschwindigkeit dieses Bausteins nicht durch Silibinin beeinflußt. Man sollte daraus schließen, daß die 5 S RNA-Synthese nicht oder nur sehr begrenzt geschwindigkeitsbestimmend für die Ribosomenbildung ist und andersartig reguliert wird.

Die Ergebnisse des Abschnitts wurden kurzlich publiziert (Sonnenbichler und Zetl, 1984).

2. Gedanken und Versuchsansätze zur Wechselwirkung von Silibinin mit dem Transkriptionskomplex der Polymerase I.

2.1 Hypothese eines steroidähnlichen Wirkungsmechanismus

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, wurde in früheren Publikationen von Machicao und Sonnenbichler (1977) gezeigt, daß Silibinin die Transkription *in vitro* mit der DNA-abhängigen-RNA-Polymerase I beschleunigt. Die Analysen der in Rattenlebern synthetisierten RNA, die ausführlich im ersten Teil dieser Arbeit dargestellt sind, bestätigen dieses Resultat *in vivo*.

In diesem Zusammenhang erhebt sich die Frage, weshalb es dem Pflanzeninhaltsstoff Silibinin möglich ist, so spezifisch in den äußerst komplizierten Prozeß der rRNA-Synthese bei Eukaryonten einzugreifen. Sonnenbichler und Pohl (1980) testeten über 40 verschiedene Flavonoide in Transkriptionssystemen mit Rattenleberzellkernen und Hepatozyten, um Einblicke in Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten. Von diesen Substanzen zeigten nur drei einen ähnlich stimulierenden Effekt auf die RNA-Synthese. Beim Vergleich der Molekulldimensionen der aktiven Verbindungen wurden Strukturähnlichkeiten des Flavonolignans Silibinin mit dem Sterangerüst postuliert. Besonders die Stellung einiger funktioneller Gruppen legte den Gedanken nahe, daß am physiologischen Rezeptor ein Verwechseln von Silibinin mit einem Steroid eintreten könnte.

Um diese Hypothese zu prüfen und gegebenenfalls zu festigen, wurde eine intensive Literaturrecherche bezüglich der Beeinflussung der rRNA-Transkription durch Steroide

durchgeführt.

Allgemein kann man sagen, daß von allen bekannten Hormonwirkungen die Steigerung der RNA-Synthese zu den am ausführlichsten untersuchten biochemischen Effekten dieser Stoffklasse gehört. Daß Steroidhormone die Synthese spezifischer mRNAs induzieren, ist vielfach beschrieben. Bemerkenswert ist aber, daß auch die ribosomale RNA-Synthese durch die meisten dieser Hormone stimuliert wird. Tab. 5 gibt einen Überblick über die wichtigsten Arbeiten zur Wirkung von Steroiden auf die rRNA-Transkription.

Der Klarheit halber sei die unterschiedliche Nomenklatur erläutert, die in den zitierten Publikationen für die RNA-Polymerase I verwendet wird und historisch bedingt ist: Polymerase I läßt sich in zwei Fraktionen auftrennen (Ia und Ib), die sich nach Chambon (1975) durch das Fehlen einer Untereinheit SA3 mit Molekulargewicht 51000 unterscheiden. Chambon äußert die Vermutung, daß SA3 erst während der Reinigung abgespalten wird und so Ia und Ib entsteht.

Beim Vergleich der Literatur ist identisch:

I a	mit	AI, AIa, IB
I b	mit	AII, AIb, IA

Die Daten der Tab. 5 wurden in den meisten Fällen folgendermaßen erarbeitet: Die Tiere erhielten das entsprechende Steroid i.p. gespritzt. Nach definierten Zeiten wurden die Organe entnommen. Kerne aus den angegebenen Geweben isoliert und in vitro für die Aktivitätsbestimmung der RNA-Polymerasen eingesetzt. Die Unterscheidung von Polymerase I und II erfolgte mittels Amanitin (siehe auch Methoden, S. 17).

Tab. 5 Stimulierung der DNA abhängigen RNA-Polymerasen durch Steroidhormone

Substanz und Zielorgan	RNA Poly I			RNA Poly II			Literatur
	%-Stimu- lierung	Optimale Dosis [mg/kg]	Optimale Wirkzeit [h]	% Stimu- lierung	Optimale Dosis [mg/kg]	Optimale Wirkzeit [h]	
Testosteron in Mause- nieren	40	40	2	60	40	1	Jaune et al. (1976)
	80		20	40		12	
Medroxypro- gesteronace- tat in Mause- nieren	50	400	4	60	400	4	Lin et al. (1978)
	250		20	keine spätere Stimulierung			
	50	40	2	20	40	1	
6 -Methyl- progesteron in Mäusenie- ren	80	40	1	60	40	1	Ventura u. Bullock (1983)
	60		16	60		20	
Cyproteron- acetat in Mäusenieren	50	40	2	50	40	1	Ventura u. Bullock (1983)
			12-16	50		20	
Flutamid in Mäusenie- ren	40	40	16	50	40	16-24	Ventura u. Bullock (1983)
17 α -Hydroxy- 6 α Methyl- progesteron in 30 Mäusenieren	65	40	0.5	40	40	1	Ventura u. Bullock (1983)
			24	30	40	24	

progestin in Mausemieren	40	40	20	50	40	0.3	Ventura u. Bullock (1983)
				25		0.5	
oestradiol in Rattenhypophyse	30	0.05	10-15	keine Stimulierung der Poly II			Le Guellec et al. (1983)
Oestradiol in foetalen Meer- schweinchenuteri	300	0.01	2-3	150	0.01	2-3	Laure u. Pasqualini (1983)
oestradiol in nicht geschlechts- reife Hahnchen- leber	100	25	24-48	70	25	24	Bieri Bonniot u. Dierks- Ventling (1977)
oestradiol in Rattenleber- uteri	500	0.01	6	nicht getestet			Weil et al. (1977)
Oestradiol in nicht geschlechts- reifen Kaninchen- uteri	350	0.01	3-12	180	0.01	0.5	Borthwick u. Smellie (1977)
				550		6-12	
Cortisonacetat in Rattenleber	70	50	4	keine Stimulierung der Poly II			Yu u. Fei- gelson (1971)
Cortisonacetat in Rattenleber	80	33	1,5	keine Stimulierung der Poly II			Okai (1982)
Hydrocortison in Rattenleber n. Nebennierenrin- denentfernung	200	30	1,5	keine Stimulierung der Poly II			Sajdel u. Jacob (1971)

Die zusammengestellten Werte der Tab. 5 zum Einfluß von Steroiden auf die RNA-Polymerasen zeigen überzeugend, daß auch die rRNA-Synthese von allen hier getesteten Steroidhormonen stimuliert wird. Eben diese Stimulierung ist auch für das Flavonolignan Silibinin bewiesen.

Besonders bemerkenswert ist ein Vergleich der Kurven, in denen der zeitliche Einfluß von Silibinin bzw. von Steroiden auf die RNA-Polymerase I Aktivität dargestellt ist, Abb. 11.

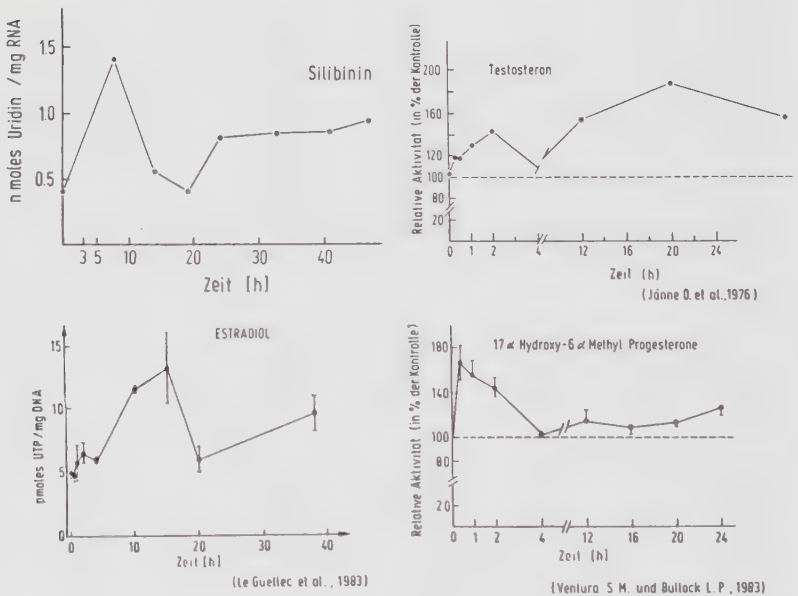


Abb. 11 ^3H -UTP Einbau durch RNA-Polymerase I in Zellkernen aus Tieren, die unterschiedlich lange mit Silibinin bzw. dem jeweiligen Steroid vorbehandelt waren.

Auffallend ist der gleiche biphasische Verlauf: es kommt relativ rasch zu einer Stimulierung, die wieder abklingt, wobei die Transkriptionsaktivität nahezu auf den Normalwert zurückfällt, um dann erneut, aber längerfristiger anzusteigen.

Trotz beachtlicher Fortschritte innerhalb der letzten Jahre kann bis heute der molekulare Mechanismus der Steroidwirkung bezüglich dieser r-RNA-Synthese-Steigerung nicht formuliert werden. Welche biochemischen Mechanismen konnten der Steigerung zugrunde liegen?

- (1) Es konnte mehr Enzym gebildet werden. Diese These wurde von manchen Autoren (Yu und Feigelson, 1971 und Sajdel und Jacob, 1971) experimentell "belegt", von anderen Autoren (Weil et al., 1977 und Borthwick und Smellie, 1975) wiederum experimentell ausgeschlossen.
- (2) Da die RNA-Polymerase I in freier und chromatingebundener Form vorliegt (Yu, 1974, 1975, Kellas et al., 1977), wäre denkbar, daß Steroide dieses Gleichgewicht verschieben. Träger postulierte 1977, daß Steroide den Ionenquotienten der Zelle beeinflussen und damit die Affinität der RNA-Polymerase zum Template verändern konnten.
- (3) Von Chambon (1975) werden Stimulationsfaktoren diskutiert, die ähnlich wie das σ -Protein bei Prokaryonten die Initiation erhöhen sollen. Ergänzend beschreibt Träger (1977) eiweißartige Faktoren, die die Aktivität der RNA-Polymerase I steuern. Dazu zählen das von Baulieu et al. (1972) postulierte "key intermediate protein" = KIP, das laufend nachsynthetisiert werden muß, um die optimale Enzymaktivität der RNA-Polymerase aufrechtzuerhalten. Es wird diskutiert, daß Steroide

die Bildung von KIP beeinflussen.

Auch Anderson et al. (1972) postulieren, daß Steroide über die Komplexbildung mit kurzlebigen Faktoren die r-RNA Synthese steuern.

- (4) Die bis jetzt am besten belegte Vorstellung geht von einer Änderung in der Templateaktivierung aus. Von Weil et al. (1977) wurde dies diskutiert, von Johnson et al. (1978, 1979) experimentell wahrscheinlich gemacht. Nach Dexamethasonbehandlung ergab sich ein deutlicher Anstieg der Templateaktivität, was mit einer sehr starken Erhöhung an Bindungsstellen für die Polymerase verbunden war. Man nimmt an, daß eine Interaktion des Steroids mit Chromatin einen Wechsel in der Nukleoproteinstruktur induziert.

Romanow et al. (1984) begründen die Steroidwirkung ebenfalls mit einer Änderung in der Templateaktivität und argumentieren folgendermaßen: Die erhöhte Syntheseleistung der Polymerasen durch Steroide konnte auf die Aktivierung sonst durch Protein "limitierter DNA-Sequenzen" zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die stimulierende Wirkung von Steroiden auf die rRNA-Synthese überzeugend bewiesen erscheint. Der molekulare Mechanismus ist dagegen weitgehend unklar und wird mit einer Fülle von Spekulationen verknüpft.

Im Vergleich zu den Steroiden zeigt Silibinin eine überraschend ähnliche Wirkkurve (Abb. 11) auf die rRNA-Synthese. Dies unterstützt die aus Molekülvergleichen stammende Hypothese (Sonnenbichler und Pohl, 1980), wonach Silibinin an Steroidrezeptoren mit dem physiologischen Effektor verwechselt werden könnte.

Die für Steroide diskutierte Annahme, daß unter dem Einfluß der Hormone mehr Enzym bereitgestellt wird, kann für Silibinin aufgrund der Ergebnisse von Machicao und

Sonnenbichler (1977) ausgeschlossen werden. Diese Autoren beschrieben die Stimulierung der Transkriptionsaktivität in vitro mit proteinfreier DNA als Template mit definierten Mengen gereinigter RNA-Polymerase I.

Aufgrund dieser in vitro Ergebnisse mit isolierter Polymerase I liegt es nahe, anzunehmen, daß

- (a) das Enzym mit einer seiner Untereinheiten selbst eine Wechselwirkung mit Silibinin eingeht und dadurch aktiviert wird oder,
- (b) daß Regulationsfaktoren aktiviert werden, die zumindest teilweise zusammen mit Polymerase isoliert werden.

2.2 Versuche zur Bindung von Silibinin an Komponenten des Transkriptionskomplexes

Um die Bindung von Silibinin an die RNA-Polymerase I bzw. an den Transkriptionskomplex zu studieren, schien es sinnvoll, das Flavonolignan radioaktiv zu markieren. Damit wäre auch möglich, das "Steroidkonzept" weiter zu verfolgen und eventuell die Wechselwirkung von Silibinin mit bereits bekannten, isolierbaren Steroidrezeptoren zu untersuchen.

2.2.1 Versuche mit ^3H -Silibinin

Von Sonnenbichler et al. (1980) wurde eine radioaktive Markierung von Silibinin mit Tritium beschrieben.

Nach i.p. Applikation von 100 μCi ^3H -Silibinin an Ratten und nach Isolierung des Chromatins wurden die chromosomalen Proteine und die Nukleinsäuren mittels isopyknischer Zentrifugation nach Sonnenbichler et al. (1977) in 2M CsCl + 5M Harnstoff getrennt.

Die Analyse nach Fraktionierung ergab, daß das Flavonolignan nachweisbar nur an die chromosomalen Proteine assoziiert. Nach Fällung der Proteine mit Aceton zeigte sich, daß 20 -

30 % der Radioaktivität gebunden bleiben, d.h. daß zum Teil relativ stabile Bindungen an Protein vorliegen. Schwache Wechselwirkungen mit der DNA wurde der bei der Trennung anwesende Harnstoff freilich zunichtemachen. Detaillierte Aussagen, welche Proteine Bindungen eingehen, waren nach Fraktionierung der Polypeptide mit der zur Verfügung stehenden spezifischen Radioaktivität von Silibinin (300 mCi/mMol) wegen zu geringer Nachweisempfindlichkeit nicht möglich.

2.2.2 Markierung von Silibinin mit Jod

Um eine günstigere Nachweisgrenze zu erreichen, wurde eine Radiosynthese zur Markierung von Silibinin mit ^{131}J Jod ausgearbeitet.

Um den Zusammenhang der eigentlichen Thematik dieser Arbeit nicht zu storen, werden die Synthese und die spektroskopische Charakterisierung der Jodderivate in einem Anhang beschrieben.

Bei der Reaktion von Silibinin mit KJ und H_2O_2 entstehen bei Raumtemperatur zu 55% 8-Jodsilibinin und zu 30% 6,8-Dijodsilibinin.

2.2.3 In-vitro-Transkriptionsteste mit dem Monojodderivat

Ziel der Jodmarkierung war, mit radioaktivem Monojodsilibinin die Wechselwirkung dieses Flavonolignans mit Chromatin und Polymerase I-Präparationen zu studieren und speziell der Frage nachzugehen, ob und an welche Untereinheit Silibinin bindet. Vor Beginn der Radiosynthese mußte aber sichergestellt werden, daß das Jodderivat eine ähnlich stimulierende Wirkung auf die rRNA-Transkription ausübt wie Silibinin.

In einem *in vitro* Transkriptionstest mit isolierten Zellkernen, wie auch in einem Transkriptionssystem mit gereinigter RNA-Polymerase I wurde das Monojodsilibinin, das wie Silibinin in 50 % DMSO/50 % H₂O gelöst war, mit unterschiedlichen Konzentrationen getestet.

Aus Abb. 12 ist allerdings zu erkennen, daß im Gegensatz zu Silibinin das Monojodderivat keine Erhöhung des Einbaus von ³H-Uridin weder im Transkriptionstest mit gereinigten Zellkernen noch beim *in vitro*-Test mit gereinigter RNA-Polymerase I bewirkt.

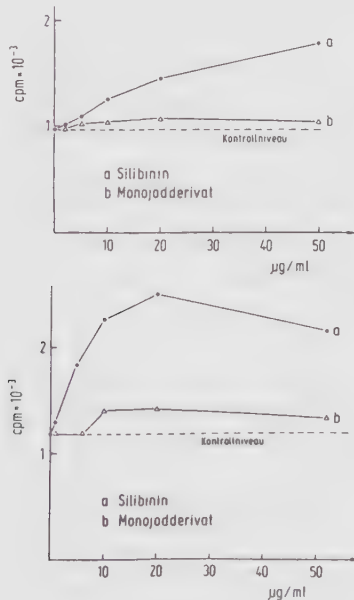


Abb. 12 In *in vitro* Transkriptionsteste mit steigenden Konzentrationen von Silibinin bzw. Monojodsilibinin mit isolierten Zellkernen (obere), mit gereinigter Polymerase I (untere Darstellung)

Dieses Ergebnis war zunächst sehr enttäuschend, da die geplanten Untersuchungen nicht durchgeführt werden konnten. Die Markierung von Silibinin mit ^{131}J schien damit uninteressant für die skizzierte Fragestellung. Es ist jedoch bemerkenswert, daß die Substitution des Molekuls mit einem Jodatom und die damit verbundene Änderung der Molekuldimension bereits ausreicht, um die beschriebene Stimulierung der RNA-Synthese durch Silibinin aufzuheben. Man darf eine sehr spezifische Wechselwirkung mit dem in Frage kommenden Bindungsort annehmen.

3. Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Synthese in Rattenlebern und Zellkulturen durch Silibinin

Auf Grund von klinischen Doppelblindstudien haben u.a. Fintelmann und Albert (1980) gezeigt, daß die Leberregeneration bei der geschädigten Leber unter dem Einfluß von Silibinin deutlich verbessert ist. Leberregeneration heißt vom biochemischen Standpunkt aus gesteigerte Proliferation und damit gesteigerte DNA-Synthese.

Für die Regulation der mitotischen Aktivität einer Zelle sind neben auslösenden Triggersignalen und einigen noch weitgehend unbekannten Proliferationsfaktoren die Erhöhung der RNA- und Proteinsynthese von großer Bedeutung (Bucher et al., 1983, Goldberg 1985). Da Silibinin die RNA-Synthese und als Konsequenz davon auch die Protein-Biosynthese stimuliert (Rosen, 1980), stellte sich die Frage, ob als Folge dieser Aktivierung auch die DNA-Synthese beeinflußt wird. Diese Fragestellung ist auch vom pharmakologischen Standpunkt aus wichtig, da von einer Beeinflussung der DNA-Synthese auch "schneller proliferierende Zellen" betroffen werden konnten und Silibinin dann einen Einfluß auf das Wachstum maligner Zellen haben konnte.

Um dies zu untersuchen, wurde die DNA-Synthese unter dem Einfluß von Silibinin in normalen Rattenlebern und in teilhepatektomierten Ratten in vivo, außerdem in vier unterschiedlichen malignen Zelllinien gemessen.

3.1 Bestimmungen der Precursorkonzentrationen

Zur Messung der DNA-Synthese in Zellen, wird radioaktives Thymidin als spezifischer Baustein der DNA eingesetzt. Die Menge des in hochmolekulare Nucleinsäuren eingebauten radioaktiven Thymidins gibt ein Maß für die Synthesegeschwindigkeit der DNA. Diese Methode ist jedoch nur dann brauchbar, wenn vorher sichergestellt wurde, daß die Aufnahme des Thymidins in die Organe der zu untersuchenden Tiere oder in die Zelllinien durch Silibinin nicht verändert wird. Unterschiedliche Precursorpools in den zu vergleichenden Zellen würden zwangsläufig Differenzen in der spezifischen Radioaktivität der neusynthetisierten DNA bedingen. Bei allen hier beschriebenen Versuchen wurde deshalb die Aufnahme des radioaktiven Thymidins stets genau gemessen. Hierzu wurden mehrere Methoden verwendet:

- (a) Die Precursorpools in vivo wurden so bestimmt, daß nach i.p. Applikation von radioaktivem Thymidin dessen Konzentration im gesamten Lebergewebe gemessen wurde. Untersucht wurde der Thymidin-uptake in Leberzellen von Silibinin behandelten und unbehandelten, normalen und teilhepatektomierten Ratten zu den Zeitpunkten, an denen auch die DNA-Markierung gemessen wurde. Die Meßdaten sind in Tab. 7 und 8 mit aufgenommen und werden dort diskutiert. In keinem Fall bewirkte Silibinin eine Änderung in den Precursorpools der Zielorgane.
- (b) In Hepatozytenkulturen, präpariert aus Lebern von normalen und teilhepatektomierten Ratten, die mit bzw. ohne Silibinin vorbehandelt worden waren, wurde der Uptake von ^3H -Thymidin in vitro in die Hepatozyten gemessen. Dabei wurde die säurelösliche Radioaktivität in den Zellen bestimmt (Tab. 6).

Tab. 6 Aufnahme von ^3H -Thymidin [cpm/ 5×10^4 Zellen] in Hepatozyten von normalen und teilhepatektomierten Ratten nach und ohne Vorbehandlung mit Silibinin in vivo (2,7 mg/100 g Körpergewicht)

	Zeit [min]		
	10	20	60
normale Lebern			
+ Silibinin	434 $\pm$ 34	444 $\pm$ 3	395 $\pm$ 16
- Silibinin	431 $\pm$ 20	446 $\pm$ 20	383 $\pm$ 23
teilhepatektomierte Lebern			
+ Silibinin	966 $\pm$ 45	1041 $\pm$ 95	605 $\pm$ 54
-Silibinin	961 $\pm$ 40	1092 $\pm$ 131	608 $\pm$ 52

Wie man aus Tab. 6 entnehmen kann, bedingt der Anstieg in der DNA-Synthese nach Teilhepatektomie auch eine erhöhte Thymidinaufnahme. Es konnten jedoch keine unterschiedlichen Thymidinkonzentrationen als Folge der Vorbehandlung mit Silibinin beobachtet werden.

Auch in einer zweiten Versuchsreihe, bei der das Silibinin direkt zu den Hepatozytenkulturen gegeben wurde, zeigte sich keinerlei Beeinflussung der Thymidinaufnahme bei den üblicherweise verwendeten Konzentrationen von 2 - 10 μg Silibinin/ml Medium.

(c) Auch bei den untersuchten malignen Zelllinien wurde die Aufnahme des radioaktiven Thymidins unter dem Einfluß von Silibinin durch Bestimmung der saurelöslichen Radioaktivität in den Zellen gemessen. Auch hier konnte keine Änderung der Thymidinaufnahme durch das Flavonolignan festgestellt werden.

3.2 DNA-Synthese in normalen Rattenlebern mit und ohne Silibininvorbehandlung

Bei den Untersuchungen zur Beeinflussung der DNA-Synthese in vivo wurden wiederum spezifisch pathogenfreie Wistarratten verwendet. Auch hier war die Berücksichtigung des circadianen Rhythmus von außerordentlicher Bedeutung für die Aussagekraft der Ergebnisse.

Den weiblichen Wistarratten wurden 20 h vor dem Töten unterschiedliche Mengen SIHS in 0,9% NaCl i.p. injiziert. Die Kontrollen erhielten die gleiche Menge 0,9 % NaCl.

1 h vor Entnahme der Lebern wurde jeder Ratte radioaktives Thymidin i.p. injiziert. Nach Entnahme der Lebern wurden die Kerne präpariert, daraus die DNA isoliert und deren spezifische Radioaktivität bestimmt. Zusätzlich wurde stets, wie bereits beschrieben, die Aufnahme der Radioaktivität in den Leberzellen gemessen.

Die Versuche wurden sowohl mit ^3H -Thymidin (spez. Radioaktivität 23,9 Ci/nMol) als auch mit ^{14}C -Thymidin (spez. Radioaktivität 61mCi/mMol) durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 7 aufgelistet. Die Menge appliziertes Silibinin entsprach den maximal wirksamen Mengen für die Steigerung der RNA-Synthese in vivo (vgl. S. 28).

Wie man aus Tab. 7a und b errechnen kann, sind die Precursorkonzentrationen des niedermolekularen radioaktiven Thymidins in der Leber bezogen auf 1 mg DNA ca. $3 \times$ so hoch wie die in DNA eingebaute Radioaktivität. Die Aufnahme des radioaktiven Precursors in die Leberzellen ist bei den Kontrollen und den mit Silibinin behandelten Tieren etwa gleich groß.

Tab. 7 DNA-Synthese in normalen Rattenlebern mit und ohne Silibininbehandlung

Spezifische Radioaktivität [dpm/mg DNA]

- a) nach i.p. Injektion von je 50 μCi ^3H -Thymidin
1 h vor dem Töten und 20 h nach i.p. Applikation
von unterschiedlichen Mengen SIHS
[mg/100 g Körpergewicht]
- b) nach Injektion von 10 μCi ^{14}C -Thymidin
3 h und SIHS 12 h vor dem Töten

SIHS [mg]	Anzahl der Ratten	10 ⁻³ dpm/mg DNA [Mittelwerte und Standardabweichung]	Aufnahme des radio- aktiven Thymidins 10 ⁻³ $\times$ dpm/1 g Leber- gewebe (entspricht ca. 3 mg DNA)
a) Kontrollen	16	104 $\pm$ 22	1109 $\pm$ 19
1,7	3	127 $\pm$ 26	1017 $\pm$ 27
3	10	97 $\pm$ 15	1200 $\pm$ 13
5	3	118 $\pm$ 16	1314 $\pm$ 41
b) Kontrollen	4	6,28 $\pm$ 0,56	131,74 $\pm$ 2,15
3	4	6,26 $\pm$ 0,56	133,87 $\pm$ 0,58

Aus den Daten der Tab. 7 geht hervor, daß kein signifikanter Unterschied besteht zwischen dem Thymidineinbau in DNA von Rattenlebern aus Kontrolltieren und aus Tieren, die mit SIHS vorbehandelt waren. Bei normalen Rattenlebern kann also - auch mit unterschiedlichen Silibinindosen - kein Einfluß von Silibinin auf die DNA-Synthese beobachtet werden.

3.3 Einfluß von Silibinin auf die DNA-Synthese in Lebern von teilhepatektomierten Ratten

3.3.1 Steigerung der DNA-Synthese unter dem Einfluß von Silibinin in vivo

Nachdem Silibinin keinen nachweisbaren Einfluß auf die DNA-Synthese in normalen Rattenlebern zeigte, stellte sich die Frage, ob das Flavonolignan bei einer sich regenerierenden Leber z.B. nach Teilhepatektomie, bei der der Trigger für eine erhöhte Replikation bereits gegeben ist, infolge seiner die RNA- und Proteinbiosynthese steigernden Wirkung auch die DNA-Synthese (sekundär) beeinflusst.

Werden durch Teilhepatektomie 68 % der Gesamtleber entfernt, so ist das Ausgangsgewicht der Leber innerhalb von 2 Wochen wieder hergestellt (Bucher und Swaffield, 1964). In dieser Zeit steigt die Proliferationsrate extrem an (Gerdes et al., 1971, Hays 1974). Der DNA-Gehalt pro g Lebergewicht bleibt jedoch während dieses Prozesses auf $\pm 5\%$ konstant.

Um den Einfluß von Silibinin auf die DNA-Synthese während der Regeneration von teilhepatektomierten Rattenlebern untersuchen zu können, wurde das Flavonolignanderivat sofort nach der Operation i.p. appliziert.

Aus Vorversuchen war bekannt, daß 20 h nach Teilhepatektomie ein erstes Maximum der DNA-Synthese vorliegt. Zu diesem Zeitpunkt wurden dementsprechend in der ersten Versuchsreihe die Tiere getötet und die Lebern entnommen. Wie bei den Versuchen mit normalen Ratten wurde 1 h vor dem Toten ^3H -Thymidin als Marker für die DNA-Synthese injiziert.

Die Werte des Thymidineinbaus in die Leber-DNA 20 h nach Teilhepatektomie sind in Tab. 8 für die Kontrolltiere wie auch für die mit Silibinin behandelten Tiere zusammengestellt.

Tab. 8 DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern mit und ohne Silibininvorbehandlung. Die Teilhepatektomie wurde 20 h vor dem Töten durchgeführt und gleich nach der Operation wurden jeder Ratte 3 mg SIHS in 0,9 % NaCl bzw. nur 0,9 % NaCl (Kontrollen) gespritzt. 1 h vor dem Töten wurden je 50 μCi ^3H -Thymidin injiziert. Nachdem die DNA isoliert war, wurde die spezifische Radioaktivität bestimmt.

	Anzahl der Ratten	10^{-3} dpm/mg DNA [Mittelwerte und Standardabweichung]	Aufnahme des radio- tiven Thymidins in 10^{-3} dpm / 1g Lebergewebe (entspricht ca. 3 mg DNA)
SIHS	10	2367 ± 326	10261 ± 1846
behandelt			
(3mg/100g)	10	2306 ± 290	9343 ± 1304
Kontrollen	10	1922 ± 287	10285 ± 1003
	10	1921 ± 338	10339 ± 1636

Der DNA-Gehalt pro g Leber blieb bei allen Tieren, auch nach Silibininvorbehandlung auf $\pm 5\%$ konstant. Tab. 8 zeigt aber einen bemerkenswerten Unterschied zwischen den Werten des Thymidineinbaus in die DNA der regenerierenden Rattenleber von Tieren, die mit Silibinin behandelt worden waren im Vergleich zu den aus unbehandelten Tieren. Die erhaltenen Daten zeigen einen Anstieg der DNA-Synthese um ca. 20 % nach Silibininbehandlung.

Um zu überprüfen, ob die experimentell gefundenen Unterschiede aussagekräftig sind, wurde der "Student-Faktor"

(Sachs, 1978) berechnet und für die Signifikanz dieses Befundes eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 96 % erhalten.

Eine Dosisabhängigkeit wurde in diesem Zusammenhang nicht erstellt, da angenommen werden darf, daß der Effekt von Silibinin auf die DNA-Synthese ein sekundärer ist, d.h. die Konsequenz der bereits beschriebenen Stimulierung der r-RNA Synthese über die Aktivierung der RNA-Polymerase I-Reaktion (Machicao und Sonnenbichler, 1977). Die applizierten Silibininmengen entsprachen wieder denen, die bei der Stimulierung der RNA-Synthese als optimal gefunden worden waren.

3.3.2 Zeitverlauf der DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern unter dem Einfluß von Silibinin

Die DNA-Synthese beginnt nach Teilhepatektomie synchronisiert und zeigt einen wellenförmigen Verlauf (Bucher und Malt, 1971). Um sicherzustellen, daß einerseits unter Silibinin der zeitlich gleiche Verlauf der DNA-Synthese erhalten bleibt und daß andererseits bei den 20 h Werten der Tab. 8 wirklich eine Stimulierung vorliegt und nicht nur ein zeitlich verschobenes Maximum beobachtet wird, wurde auch der Zeitverlauf der DNA-Synthese in den Rattenlebern nach Teilhepatektomie mit und ohne Silibininbehandlung untersucht (Abb. 13).

Die Durchführung der Versuche erfolgte wie in Tab. 8 und auf S. 18 beschrieben, jedoch variierten die Zeitpunkte des Tötens nach der Teilhepatektomie.

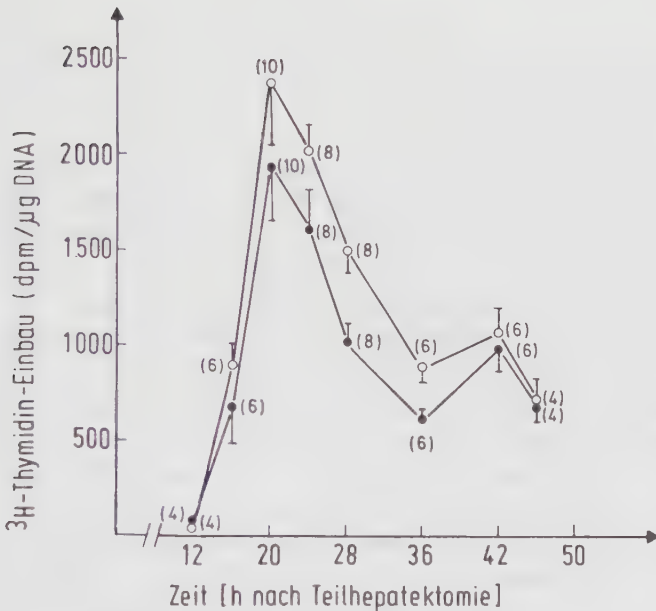


Abb. 13 Zeitkurve der DNA-Synthese in teilhepatektomierten Rattenlebern mit 3 mg/100 g SIHS (o-o-) und ohne (●-●-; Kontrollen). Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Wie man aus Abb. 13 entnehmen kann, bleibt der wellenformige Verlauf der Replikation unter dem Einfluß von Silibinin erhalten und erleidet auch keine Zeitverschiebung. Zwischen 20 - 30 h nach Teilhepatektomie kann ein Anstieg der DNA-Synthese von 23 - 35 % beobachtet werden. In diesem Zeitintervall beträgt die Signifikanz der Stimulierung $p > 0,005 - 0,001$.

3.4 DNA-Synthese in malignen Zelllinien in Gegenwart von Silibinin

Wie einleitend erwähnt, war es mit Blick auf pharmakologische Gesichtspunkte außerordentlich interessant und wichtig, festzustellen, ob Silibinin (via RNA-Syntheseanhebung) in malignen Zellen die DNA-Replikation stimuliert. Um den Einfluß des Flavonolignans auf die DNA-Synthese in einigen Krebszellen zu untersuchen, wurden menschliche Hepatomzellen der Zelllinie Alexander (Alexander et al. 1976) und Zajdela-Ascites-Hepatomzellen aus Ratten (Zajdela, 1964), ferner HeLa-Zellkulturen, die von menschlichen Portio-Carcinom-Zellen (Scherer et al. 1953) stammen und Raji-Zellen, eine lymphoblastoide Zelllinie aus Burkitt's Lymphom (Pulvertaft 1964) eingesetzt. Bei den Raji-Zellen handelt es sich um virustransformierte menschliche Lymphozyten, die Kopien des Epstein-Barr-Virus im Genom enthalten (Zur Hausen und Schulte-Holthausen, 1970 und Adams et al. 1973).

In allen vier Zellkulturen wurde untersucht, ob unter dem Einfluß von Silibinin a) eine Änderung der Wachstumsrate und b) eine Beeinflussung der Geschwindigkeit der DNA-Synthese stattfindet.

- (a) Bei allen Zelllinien wurden die Wachstumskurven über 5 Tage ohne Silibinin und mit unterschiedlichen SIHS-Konzentrationen durch Auszählen der Zellen bestimmt. Die in Abb. 14 dargestellte Wachstumskurve für Raji-Zellen steht stellvertretend für die anderen drei Zelllinien. In allen Fällen konnte bis zu einer Konzentration von 20 μg SIHS/ml Medium kein Unterschied in der Wachstumsrate im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

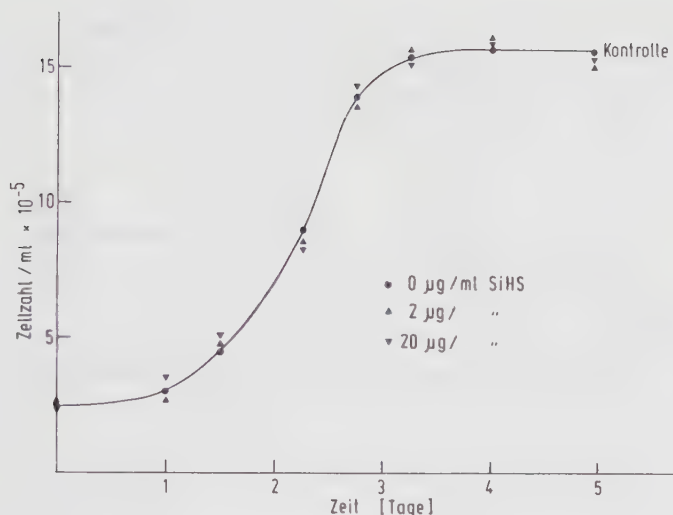


Abb. 14 Wachstumskurven von Burkitt-Lymphoma-Zellen, Linie Raji ohne und unter dem Einfluß von Silibinin

(b) Um die DNA-Synthese in Gegenwart von unterschiedlichen SIHS-Konzentrationen untersuchen zu können, wurde in die oben erwähnten Zellkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase unter sterilen Bedingungen SIHS und ^3H -Thymidin zur Markierung der neusynthetisierten DNA zugesetzt und die Einbaurrate in DNA zeitabhängig gemessen. Durch die Versuchsanordnung (S.19) war gewährleistet, daß in allen Kulturen die gleiche Ausgangskonzentration an Zellen und eingesetzter Radioaktivität vorlag. Anschließend wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen, die DNA aus den Zellen isoliert und ihre spezifische Aktivität bestimmt. Abb. 15.

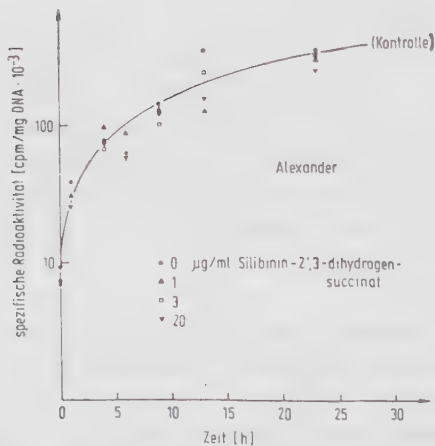
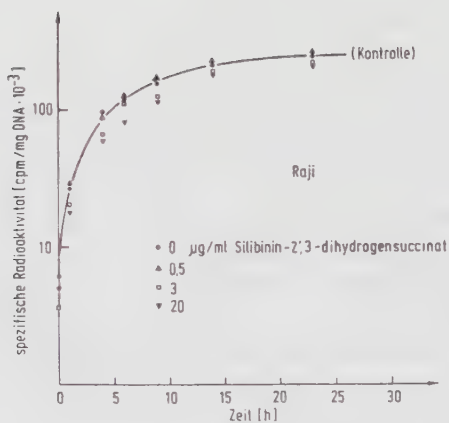


Abb. 15 Zeitabhängiger Einbau von ³H-Thymidin in die DNA von
 a) Burkitt Lymphomazellen, Linie Raji (Anfangskonzentration 8,8 x 10⁵ Zellen/ml mit 0,66 µCi ³H-Thymidin /ml Medium)
 b) Menschliche Hepatomzellen, Linie Alexander (Anfangskonzentration 0,8 x 10⁵ Zellen/ml mit 0,45 µCi ³H-Thymidin/ml Medium)

Abb. 15 zeigt, daß der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA weder bei Alexander noch bei Raji-Zellen durch Silibinin bis zur untersuchten Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ beeinflusst wird. Für HeLa und Rattenhepatomzellen (Linie Zajdela) wurden sehr ähnliche Kurven erhalten: auf eine bildliche Darstellung wurde daher verzichtet.

Um den untersuchten Konzentrationsbereich des Flavonolignans zu erweitern, wurde der ^3H -Thymidineinbau nach 6 h mit steigenden SIHS-Konzentrationen in den vier Zellkulturen gemessen. Die Ergebnisse für Raji und Alexanderzellen sind in Abb. 16 dosisabhängig wiedergegeben. HeLa- und Zajdela-Hepatomzellen zeigten analoge Kurvenverläufe.

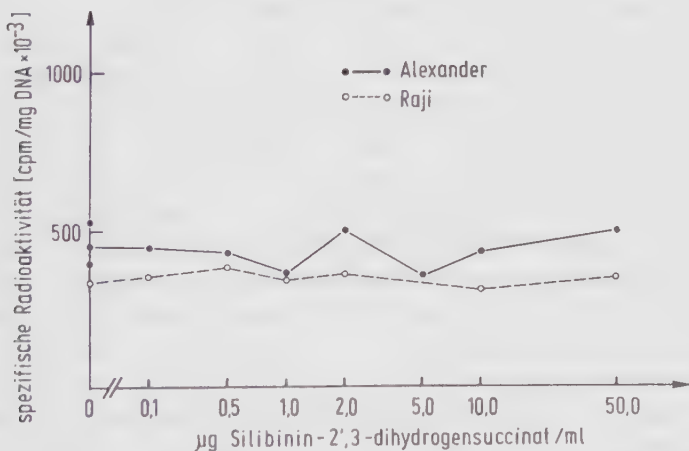


Abb. 16 Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA von a) Raji- und b) Alexander-Zellen

6 h nach Zugabe von 1 μCi ^3H -Thymidin/ml Medium bei unterschiedlichen SIHS-Konzentrationen. Zellkonzentrationen wie in Abb. 15.

In allen vier Zellkulturen konnte auch bei höheren Silibininkonzentrationen kein Einfluß des Flavonolignans auf die DNA-Synthese beobachtet werden.

3.5 Diskussion der Ergebnisse zur Beeinflussung der DNA-Synthese durch Silibinin

Radioaktives Thymidin ist bei weitem der am meisten eingesetzte Precursor für die Analyse der DNA-Synthese in Zellkulturen und in Tierorganen. Die Probleme, die mit der Injektion von ^3H -Thymidin auftreten, liegen in der möglichen unterschiedlichen Resorption und damit in dem eventuell ungleichen Vorläuferangebot. Deshalb wurde stets die radioaktive "Versorgung" der Organe bestimmt und durch unterschiedliche Methoden kontrolliert, um sicherzustellen, daß stets ein gleicher Precursor-Pool vorlag. Ferner ist bei Versuchen zur Messung der DNA-Synthese in vivo zu berücksichtigen, daß die Replikation in Rattenlebern einem circadianen Rhythmus unterliegt (Echane et al. 1971). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es außerordentlich wichtig, dieser Tatsache Rechnung zu tragen und die Operationen, Injektionen und das Töten stets zur gleichen Tageszeit durchzuführen.

Die Resorptionskinetiken für Silibinin wurden bereits 1980 von Sonnenbichler et al. publiziert. Wegen seiner besseren Wasserlöslichkeit wurde auch in den hier beschriebenen Versuchsreihen SIHS injiziert, welches durch die Leberesterasen innerhalb 30 min. vollständig zu Silibinin gespalten wird (Koch und Tscherny, 1983). Die applizierten Silibinindosen entsprachen denen, die bei der RNA-Synthese als optimal gefunden wurden. Dies erschien deshalb sinnvoll, weil angenommen werden darf, daß ein Effekt von Silibinin auf die DNA-Synthese sekundär ist, nämlich eine Konsequenz der beschriebenen Steigerung der rRNA-Synthese und

Proteinbiosynthese. Man kann von keiner einzelnen biochemischen Reaktion sagen, daß sie allein den entscheidenden Faktor für die DNA-Synthese darstellt. Zweifelsohne sind aber die geschwindigkeitsbestimmenden Bedingungen der DNA-Replikation nach einem Triggersignal und neben einigen Proliferationsfaktoren die Protein- und die RNA-Synthese (Goldberg 1985, Bucher et al. 1983).

Bei den durchgeführten Experimenten mit normaler Leber konnte - trotz eines bemerkenswerten Anstiegs der RNA-Synthese - kein nennenswerter Einfluß des Silibinins auf die DNA-Synthese beobachtet werden (Tab. 7). In gesunden Lebern ist die Proliferationsrate extrem niedrig, ca. 1 - 2 Mitosen/10⁴ Zellen (Sheimin et al., 1978) und offensichtlich ist ihre Regulation so streng, daß sie durch Änderungen in der RNA-Synthese nicht beeinflusst wird.

Aufregende Ergebnisse wurden dagegen bei teilhepatektomierten Ratten erhalten: die Kontrollen zeigten bereits, wie erwartet werden muß, einen starken Anstieg der DNA-Synthese. In Gegenwart von Silibinin stieg der Thymidineinbau in neusynthetisierte DNA 20 - 32 h nach Teilhepatektomie jedoch zusätzlich noch um ca. 30 %. Um festzustellen, ob die gemessenen Unterschiede (Mittelwerte in Tab. 8) aussagekräftig sind, wurde der "Student-Faktor" errechnet, der für die Signifikanz der Stimulierung eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 95 % ergab.

Das Ausmaß der Stimulierung der DNA-Synthese in teilhepatektomierten Lebern durch Silibinin entspricht etwa dem in Kapitel 1 beschriebenen Anstieg der RNA-Synthese. Augenscheinlich verhält es sich so, daß wenn das regulatorische Signal für die Initiation der Replikation einmal gegeben ist, der Anstieg in der r-RNA-Syntheserate sekundär auch die DNA-Synthese beschleunigt.

Das vorliegende Resultat, daß das Flavonolignanderivat die DNA-Synthese in Zellen von teilhepatektomierten Rattenlebern

stimuliert, stimmt sehr gut mit histologischen und morphologischen Daten von Magliuli et al. (1973 und 1979) überein. Diese Autoren fanden unter Verwendung von stathmokineticischen Indizes mit Colchicin in teilhepatektomierten und mit Silibinin behandelten Tieren eine durchschnittliche Erhöhung der Mitoserate um ca. 16 %. Die Lebermassen zeigten am 2. Tag nach der Teilhepatektomie einen Anstieg von 26 %. Aus Abb. 13 ist bei gleichem DNA-Gehalt/g Leber eine Stimulierung der DNA Synthese um 23 - 35 % erkennbar.

Diese Daten stützen die klinischen Befunde, wonach Silibinin die Regenerationsfähigkeit von Lebern nach massiver Schädigung durch Intoxikation oder Virusinfektion signifikant erhöht (Fintelman und Albert, 1980, Kieseewetter et al., 1977 und Benda et al., 1980).

Im Vergleich zur komplexen Situation im lebenden Tier, kann die DNA-Synthese in Zellkulturen wesentlich einfacher gemessen werden. Um festzustellen, ob die Proliferation von schnellwachsenden malignen Zellkulturen durch Silibinin beeinflusst wird, wurden zwei Hepatomzellkulturen, nämlich menschliche Hepatomzellen, Linie Alexander und Rattenhepatomzellen, Linie Zajdela verwendet. Zusätzlich wurde der Einfluß von Silibinin auf HeLa-Zellen und Burkitt-Lymphoma-Zellen, Linie Raji untersucht. Bezüglich der Proliferationsrate wurden bis zu relativ hohen Konzentrationen von SIHS im Medium (20 µg/ml) keine Unterschiede in der Zellvermehrung erkennbar (Abb. 14). Dieses Ergebnis wurde zusätzlich dadurch bestätigt, daß auch keine Erhöhung der Einbaurates von Thymidin in die DNA dieser Zellkulturen beobachtet werden konnte (Abb. 15 und 16).

Obwohl diese Resultate nicht generell auf andere maligne

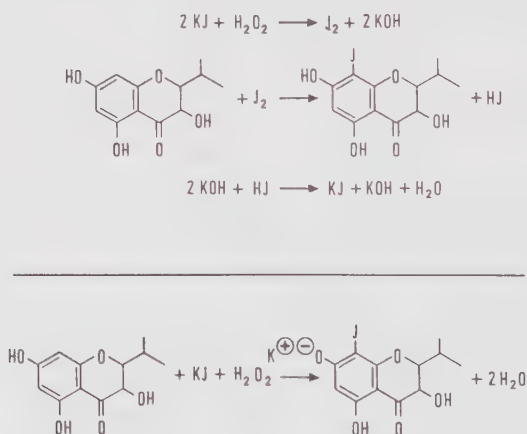
Zelllinien übertragen werden dürfen, liegt doch die Vermutung nahe, daß in malignen Zellen die Proliferationsrate bereits maximal läuft und nicht zusätzlich intensiviert werden kann. Die Befunde, daß Silibinin die Proliferation von Krebszellen nicht stimuliert, sind pharmakologisch interessant und auch wichtig, da dies eine Vorbedingung für die klinische Anwendbarkeit jeder Droge darstellen muß.

IV. Anhang

1. Jodierung von Silibinin

Zur Jodierung von Silibinin wurden in Vorversuchen mit nicht radioaktivem Halogen zuerst die geeigneten Reaktionsbedingungen erarbeitet und die Struktur der dabei gebildeten Silibininjodderivate aufgeklärt.

In Hinblick auf die geplante Radiosynthese wurde letztlich folgender Reaktionsansatz ausgewählt.



Die erhaltenen Produkte wurden nach einer Vorreinigung auf DC-Kieselgelplatten über HPLC fraktioniert.

Wie aus Abb. 17 und Tab. 9 erkennbar ist, fallen nach der bei Raumtemperatur durchgeführten Reaktion drei Hauptprodukte an.

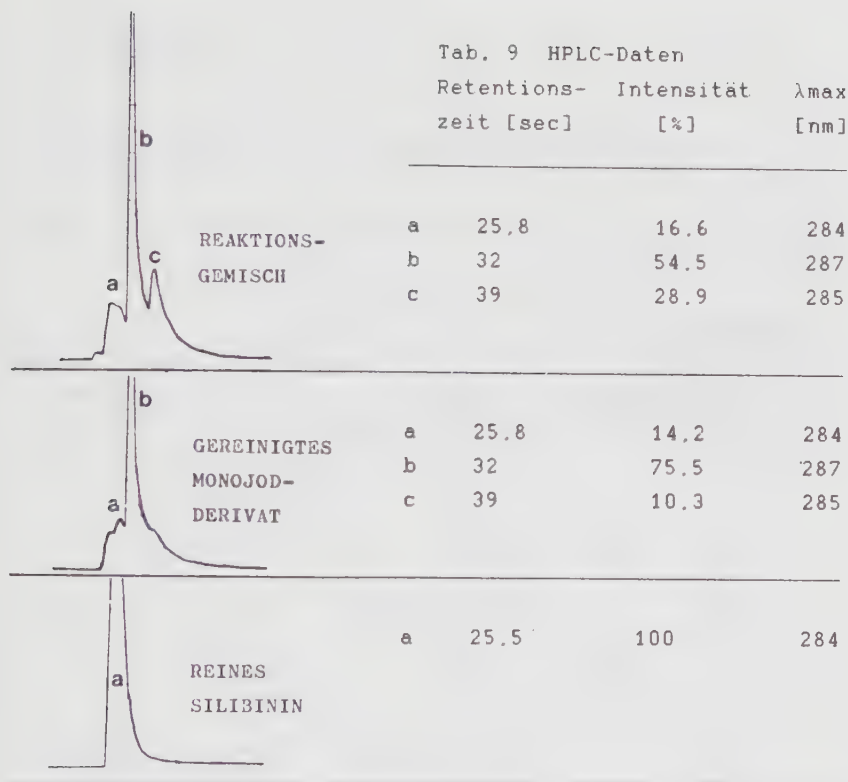


Abb. 17 HPLC-Elutionsbilder nach Trennung an einer reversed-phase Säule RP18 in 50% Acetonitril/ 50% H₂O mit 0.5% Essigsäure
a = Silibinin, b = Monojodderivat, c = Dijodderivat

In Verbindung mit der nachstehend beschriebenen Strukturana- lyse ergibt sich, daß zu 55 % ein Monojodsilibinin und zu 29 % ein Dijodderivat entstehen. Ca. 16 % Silibinin werden unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht halogeniert.

2. Spektroskopische Charakterisierung der Jodderivate

Die Charakterisierung der Substitution erfolgte durch spektroskopische Methoden.

Massenspektren

Zur Analyse der angefallenen Reaktionsprodukte wurden zunächst Massenspektren gemessen, wovon das des Monojodderivates als Beispiel in Abb. 18 dargestellt ist.

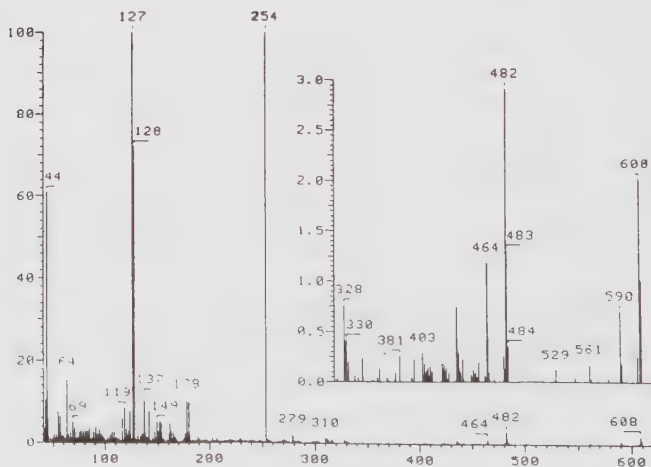
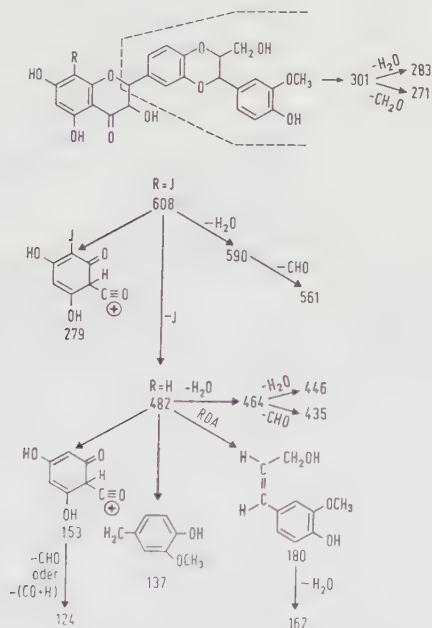


Abb. 18 Massenspektrum von Monojodsilibinin

Die Massenspektren zeigten, daß es sich bei den beiden Hauptprodukten um ein Monojod- und ein Dijodsilibinin handelt.

Die Fragmentierung zu Abb. 18 kann nach folgendem Schema interpretiert werden:

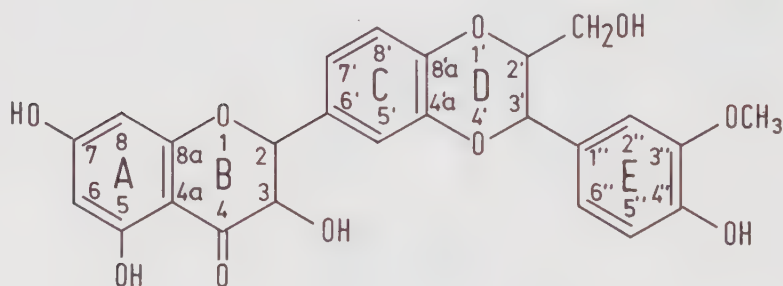


NMR-Spektren

Zur Bestimmung der Substitution wurden NMR-Spektren gemessen. Protonenspektren von Silibinin sind bereits von Hänsel et al. (1969), Wagner et al. (1971) und Arnone et al. (1979) beschrieben.

Zur eindeutigen und vollständigen Zuordnung der Protonensignale des Silibinins wurden bei 500 MHz normale und 2D-Spektren H/H-korreliert (COSY) und NOE-korreliert (NOESY) von Silibinin gemessen, Abb. 19.

Um Mißverständnisse, die aufgrund unterschiedlicher Benennungen und Zählweisen entstehen könnten, zu vermeiden, wird bei der Angabe der Daten die nach IUPAC korrekte Zählweise und Nomenklatur für das Flavonolignan Silibinin gewählt:



2-[2,3-Dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-on

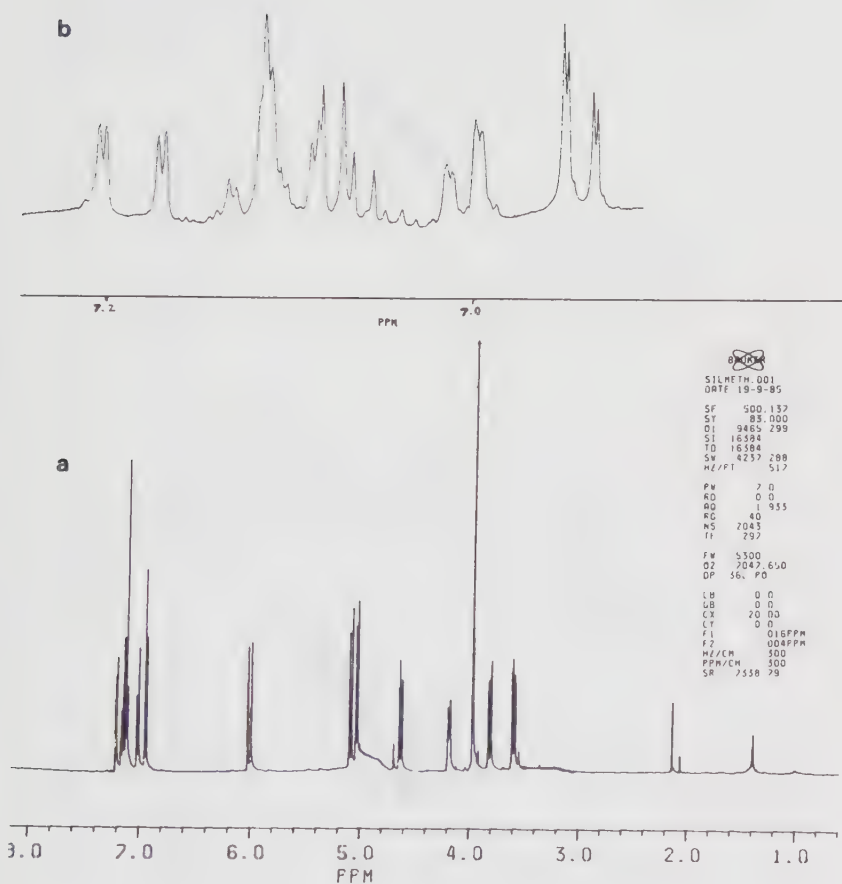


Abb. 19 Normale Protonenspektren von
 Silibinin in Methanol bei 25 ° (500 MHz)
 a) Gesamtspektrum
 b) gedehnter Aromatenbereich

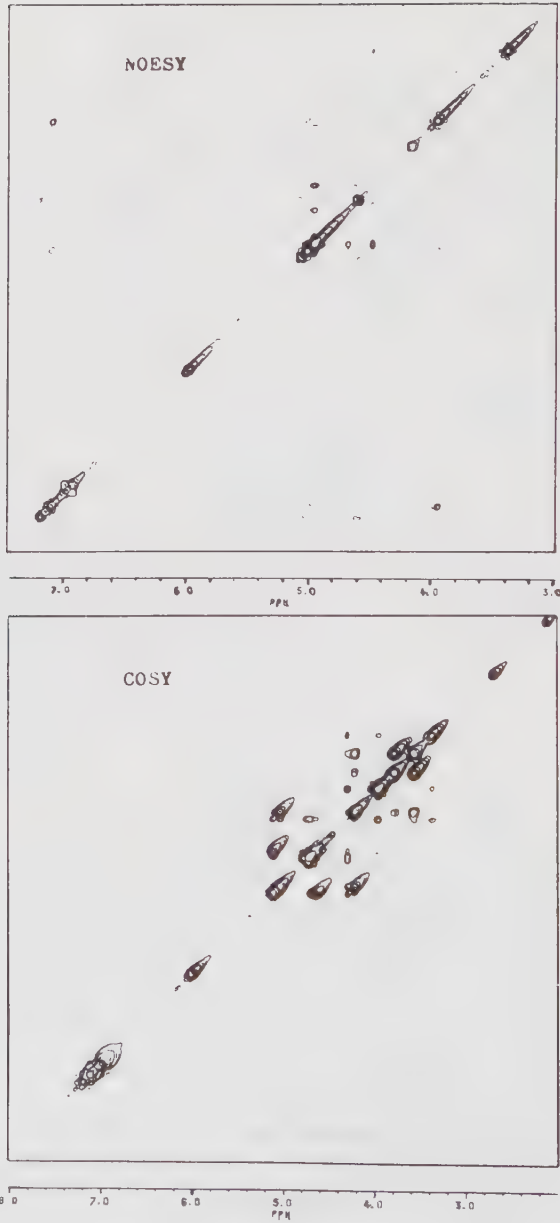


Abb. 20 H/H-COSY und NOESY-Spektren von Silibinin in Methanol bei 25° (500 MHz)

Die NMR-Spektren der Reaktionsprodukte nach Jodierung sind in Abb. 21 wiedergegeben.

Die Parameter sind auf S. 84 aufgelistet und interpretiert.

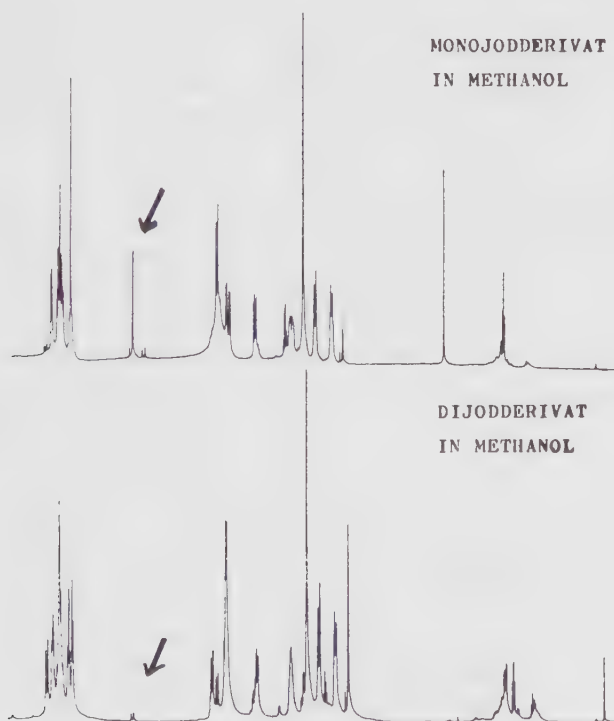


Abb. 21 NMR-Spektren der Jodderivate in Methanol [500 MHz]

a) Monojodderivat

b) Dijodderivat

Tab. 10 NMR-Daten von a) Silibinin, b) 8-Jodsilibinin in CD_3OD ($\text{CHD}_2\text{O} = 3.41 \text{ ppm}$) bei 25°

Proton am C	chem. Verschiebung [ppm]	Zahl	Kopplung	[Hz]
a) 2	5.09	(1)	d	11.5
* 3	4.63	(1)	dd	11.5/3.8
* 6	6.00	(1)	dd	2.1/2.0
8	6.03	(1)	d	2.1
2'	4.19	(1)	m	
3'	5.03	(1)	d	8.0
** 5'	7.20/7.17	(1)	d	1.8
** 7'	7.13/7.10	(1)	dd	ABC 8.3/1.8
** 8'	7.08/7.07	(1)	d	
2''	7.11/7.113	(1)	d	1.5
5''	6.95/6.953	(1)	d	ABC 8.1
6''	7.01/7.013	(1)	dd	
CH ₂ O	3.60	(1)	dd	ABC 12.3/4.5
	3.81	(1)	dd	
OCH ₃	3.97	(3)	s	12.3/2.4
b) 2	5.09	(1)	d	11.6
* 3	4.60	(1)	dd	11.6/6.7
* 6	6.17	(1)	d	~3
*** 2'	4.14/4.11	(1)	m	
*** 3'	4.97/4.93	(1)	d	8.1
** 5'	7.23/7.21	(1)	d	1.3
** 7'	7.14	(1)	dd	ABC 8.3/1.3
** 8'	7.08/7.07	(1)	d	
2''	7.11	(1)	d	~1.0
5''	6.970	(1)	d	ABC 8.1
6''	6.975	(1)	dd	
CH ₂ O	3.60	(1)	dd	ABC 12.4/6
	3.82	(1)	dd	
OCH ₃	3.97	(3)	s	12.4/1.5

Aufgrund der guten spektralen Auflösung bei 500 MHz konnten alle Protonenresonanzen von Silibinin identifiziert und zugeordnet werden. Tab. 10.

Die mit * bezeichneten Protonen zeigen eine Kopplung zu entsprechenden HO-Gruppen, die wegen Wasserstoffbrücken zu benachbarten Carbonylgruppen nur langsam mit Deuterium austauschen.

Die Resonanzen der Ringe C (**) und E treten doppelt auf, da das Molekül als Diastereomerenpaar vorliegt und zwar in folgenden Konfigurationen: 2R, 3R, 2'S, 3'S und 2R, 3R, 2'R, 3'R (vgl. Lotter und Wagner, 1983).

Die Rotation um die Bindung C-2 zu C-6' scheint gehindert. Erkennbare Anisotropieeffekte und damit Signalverdoppelungen im Ring D (***) je nach Ringkonfiguration treten allerdings erst nach Substitution des Moleküls mit Jod an C-8 auf.

Die Zuordnung der CH₃-O-Gruppe an die Position C-3'' konnte durch ein "NOESY-Experiment" und den eindeutigen Nuclear Overhauser Effekt des Methyls auf das Proton C-2'' festgelegt werden.

Beim Vergleich der Spektren von Silibinin mit denen der Jodderivate fällt das Verschwinden der Signale bei ca. 6,0 ppm auf, die den Protonen am C-8 und C-6 entsprechen. Während im Silibininspektrum hier 2 Signale zu erkennen sind, erscheint beim Monojodderivat nur mehr 1 Signal. Im Dijodderivat sind beide Signale verschwunden und nur noch etwas Verunreinigung erkennbar.

Damit wird klar, daß beim Dijodsilibinin die Jodsubstitutionen an C-8 und C-6 erfolgt sind. Die Frage, an welchem C-Atom die Reaktion im Falle des Monojodsilibinins stattfand, ließ sich aufgrund einer Kopplung des Protons am C-6 mit dem OH am C-5, das eine Wasserstoffbrücke zum benachbarten Carbonyl ausbildet, dahingehend beantworten, daß die Jodsubstitution am C-8 erfolgt ist. Diese Annahme wird bestätigt durch Anisotropieeffekte, die das Jodatome nur

in Stellung 8 auf die Protonen des Rings C ausübt.
Beim Erwärmen lagert sich das Jodatomb in die Stellung 6 um.
Die NMR-Signale des 6-Jodsilibininis entsprechen weitestgehend wieder dem Silibininispektrum.
Die quantitative Auswertung der NMR-Spektren ergab für das 8-Jodsilibinin eine Reinheit von ca. 95 %.

V. Zusammenfassung

Durch in vitro Versuche war gefunden worden (Sonnenbichler et al. 1976), daß Silibinin die RNA-Synthese in Hepatozyten und isolierten Leberzellkernen beschleunigt. Unklar war, ob durch das Flavonolignan auch in vivo am Gesamttier eine Anhebung der Transkriptionsrate in Leberzellen bewirkt wird. Weiterhin wurde bisher nicht untersucht, welche RNA-Typen von dieser Stimulierung betroffen sind, wenn auch schon geklärt war, daß in vitro eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der RNA-Polymerase I erfolgt, die die rRNAs transkribiert.

An Wistarratten konnte nach Injektion von radioaktiver Orotsäure bestätigt werden, daß Silibinin auch in vivo die Einbaurrate von Uridin in die RNA von Leberzellen erhöht. Bei der Analyse der Zeitabhängigkeit dieser in vivo Stimulierung ergab sich, daß ca. 6 h nach Injektion des radioaktiven Precursors der deutlichste Unterschied in der Geschwindigkeit der RNA-Synthese zu beobachten ist. Ein optimaler Effekt zeigt sich nach Gaben von 1 - 10 mg Silibinin/100g Körpergewicht. Untersuchungen zur Dauer der Wirkung ergaben, daß man 8 h nach i.p.-Applikation von Silibinin eine Steigerung der RNA-Synthese um 60 % findet, die nach kurzzeitigem Abklingen nach ca. 12 h erneut auftritt und dann bis zu 40 h anhält.

Die quantitative Analyse der in vivo gebildeten RNA-Spezies mit und ohne Silibinin ergab, daß in vivo die Transkriptionsrate der ribosomalen RNA durch Silibinin gesteigert wird. Mittels Elektrophoresen an Agarosegelen sowie durch Sucrosegradientenzentrifugation konnte gezeigt werden, daß nur die 28S, 18S und 5,8S-RNAs vermehrt synthetisiert und in der Folge auch beschleunigt in die Ribosomen eingebaut werden. Im Maximum der Synthesesteigerung findet man zusätzlich eine Vermehrung des hochmolekularen 45S

rRNA-Precursors. Die poly(A)-tragenden m-RNAs wurden über Oligo(dT)-Säulen abgetrennt und die t-RNAs durch Elektrophorese an Polyacrylamid separiert. Die Synthese beider RNA-Typen wird durch Silibinin nicht nachweisbar beeinflusst, ebenso nicht die Synthese der 5S-RNA. Silibinin scheint demnach die Transkriptionsrate durch die DNA abhängigen RNA-Polymerasen II und III nicht zu verändern.

Die Hypothese, daß die Wirkung des Silibinins auf die rRNA-Synthese durch eine Bindung an Steroidrezeptoren infolge einer Verwechslung der Molekülstruktur zustandekommen konnte, wurde durch den Nachweis erstaunlicher Ähnlichkeiten der Wirkung einer Reihe von Steroiden resp. Silibinin auf die Kinetik der RNA-Polymerase I-Transkription wahrscheinlicher gemacht.

Bindungsstudien mit ^3H -Silibinin ergaben, daß Silibinin im Chromatin an Proteine, nicht an DNA gebunden wird. Zur Verbesserung der Nachweisgrenzen wurde ein Verfahren zur Markierung von Silibinin mit ^{131}I Jod ausgearbeitet. Die chemische Struktur des erhaltenen Monojodsilibinins wurde mit spektroskopischen Methoden analysiert. Nach Jodierung zeigt das Flavonolignan jedoch keinen stimulierenden Effekt mehr auf die Transkription. Offenkundig reicht die Änderung der Moleküldimension von Silibinin durch Substitution mit einem Jodatome aus, um die stimulierende Wirkung auf die RNA-Synthese zu verhindern. Dies spricht für eine sehr spezifische Wechselwirkung mit den in Frage kommenden Bindungsstellen.

Die DNA-Replikation von Zellen wird begleitet von einer Stimulierung der RNA- und Proteinsynthese. Da Silibinin beides bewirkt, lag die Frage nahe, ob umgekehrt auch die Proliferationsrate (indirekt) durch Silibinin beeinflusst wird. Um den Effekt von Silibinin auf die DNA Synthese zu untersuchen, wurde der Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNA von normalen und teilhepatektomierten Rattenlebern

ohne und in Gegenwart des Flavonolignanderivates gemessen. Während in den Lebern gesunder Tiere kein Effekt beobachtet werden konnte, erhöht sich die Einbaurate von Thymidin in die DNA von teilhepatektomierten Lebern nach Silibiningabe um ca. 20 - 25 %.

Dieses Resultat stimmt sehr gut mit histologischen und morphologischen Daten von Magliulo et al. (1973 und 1979) überein, die nach Teilhepatektomie bei Ratten unter Silibininbehandlung eine Erhöhung der Mitoserate um ca. 23 % fanden.

Darüber hinaus stützt dieses Ergebnis die klinischen Versuche (z.B. Fintelmann und Albert, 1980), die gezeigt haben, daß Silibinin die Regenerationsfähigkeit der geschädigten Leber steigern kann.

Zusätzlich wurde die DNA-Synthese in Hepatomzellen der Zelllinien Alexander und Zajdela, sowie in HeLa- und Burkitt-Lymphoma Zellen, Linie Raji untersucht. In allen diesen Kulturen konnte keine Beeinflussung der Wachstumsrate oder der DNA-Synthese durch Silibinin festgestellt werden - eine wichtige Vorbedingung für die klinische Anwendung einer Droge.

VI. Literatur

- Adams, A., Lindahl, T. und Klein, G. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2888-2892
- Alexander, J.J., Bey, E.M., Geddes, E.W. und Lecatsas, G. (1976) S. Afr. med. J. 50, 2124-2128
- Anderson, K.M., Cohn, H. und Samuels, S. (1972) Febs Letters 27, 149-152
- Arnone, A., Merlini, L. und Zanarotti, A. (1979) J.C.S. Chem. Comm., 696
- Aviv, J. und Leder, P. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412
- Baulieu, E.E., Wira, C.R., Milgrom, E. und Raynaud-Jammet, C. (1972) Acta endocr. 71, Suppl. 168, 396-401
- Benda, L., Dittrich, H., Ferenzi, P., Frank, H. und Wewalka, F. (1980) Wiener klin. Wschr. 92, 678-683
- Bieri-Bonniot, F. und Dierks-Ventling, C. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 507-513
- Blatt, B. und Feldmann, H. (1973) Febs Letters 37, 129-133
- Bonin, O. (1973) in Quantitative virologische Methodik, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 94
- Borthwick, N.M. und Smellie, R.M.S. (1975) Biochem. J. 147, 91-101

- Bray, G.A. (1960) *Analyt. Biochem.* 1, 279-285
- Brossard, N. und Nicole, L. (1968) *Can. J. Biochem.* 46, 1497-1504
- Bucher, N.L.R. und Malt, R.A. (1971) in *Regeneration of Liver and Kidney*, Little, Brown and Comp., Boston, S. 55-77
- Bucher, N.L.R. und Swaffield, M.N. (1964) *Cancer Res.* 24, 1611-1625
- Bucher, N.L.R., Mc Gowan, I.A. und Russel, W.E. (1983) in *Nerve, Organ, and Tissue Regeneration*, ed. Seil, F.I., Academic Press, New York, London, S. 455-469
- Burton, K. (1956) *Biochem. J.* 62, 315-323
- Chambon, P. (1975) *Annuv. Rev. Biochem.* 44, 613-638
- Chandra, P. (1973) in *Methoden der Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 5-6
- Dulbecco, R. und Vogt, M. (1954) *Journ. exp. Med.* 99, 167
- Echane Llanos, J.M., Aloisso, M.D., Souto, M., Balduzzi, R. und Surur, J.M. (1971) *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* 8, 309-317.
- Fintelmann, V. und Albert, A. (1980) *Therapiewoche* 30, 5589-5594

- Fodor, E.I.B. und Doty, P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Com. 77, 1478-1485
- Frimmer, M. und Kroker, R. (1975) Arzneimittelforschung 25, 394-396
- Gerdes, R.G., Rientis, K.G. und Williams, J.F. (1971) Cytobios 4, 193-207
- Goldberg, M. (1985) J. Cell. Biochem. 27, 291-302
- Greene, E.C. (1935) Trans. Amer. Phil. Soc. 27, 35-41
- Hänsel, R., Schulz, J., Pelter, A., Rimpler, H. und Rizk, A.F. (1969) Tetrahedron Letters 51, 4417-4420
- Hahn, G., Lehmann, H.D., Kurten, M., Kebel, H. und Vogel, G. (1968) Arzneimittelforschung 18, 698-704
- Haller, A.V. von (1755) in Medicinisches Lexikon, S.312
- Hays, D.M. (1974) Surg. Gynec. Obstet. 139, 609-619
- Heil, A. und Zillig, W. (1970) Febs Letters 11, 165-168
- Higgins, G.M. und Anderson, R.M. (1931) Arch. Path. 12, 186-202
- Howard, R.B. und Pesch, L.A. (1968) J. Biol. Chem. 243, 11, 3105-3109
- Jänne, O., Bullock, L.P., Bardin, C.W. und Jacob, S.T. (1976) Biochem. Biophys. Acta 418, 330-343
- Janiak, B. und Hänsel, R. (1960) Planta Med. 8, 71

- Johnson, L.K. und Baxter, J. D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1991-1997
- Johnson, L.K., Lan, N.C. und Baxter, J.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7785-7794
- Kellas, B.L., Austoker, J.L., Beebee, T.J.C. und Butterworth, P.H.W. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 583-594
- Kiesewetter, E., Leodolter, I. und Thaler, H. (1977) Leber, Magen, Darm 7, 318-323
- Kobayashi, Y. und Mandsley, V.U. (1974) in "Biological Application of Liquid Scintillation Counting", Acad. Press, New York
- Koch, H. und Tscherny, J. (1983) Archiv Pharm. 316, 426-430
- La Brecque, D.R., Feigenbaum, A. und Bachur, N.R. (1978) Science 199, 1082-1084
- Laure, F. und Pasqualini, J.R. (1983) Experientia 39, 209-210
- Le Guellec, R., Mercier, L., Le Noan, G., Duval, J. und Valotaire, Y. (1983) Biochim. 65, 25-32
- Lin, Y.C., Bullock, L.P., Bardin, C.W. und Jacob, S.T. (1978) Biochem. 17, 4833-4838
- Loening, U.E. (1967) Biochem. J. 102, 251-257
- Lotter, H. und Wagner, H. (1983) Z. Naturforsch. 38 c, 339-341

- Machicao, F. und Sonnenbichler, J. (1977) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 358, 141-147
- Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L. und Gorini, S. (1973) Arzneimittelforschung 23, 161-167
- Magliulo, E., Scevola, D. und Carosi, G.P. (1979) Arzneimittelforschung 29, 1024-1028
- Mainwaring, W.I.P., Parish, J.H., Pickering, J.D. und Mann, N.H. (1982) Nucleic Acid Biochemistry and Molecular Biology, Blackwell Scientific Publications Oxford, London 1769-1776
- Mejbaum, W. (1939) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 258, 117-120
- Mishima, H., Kurabayashi, M. und Hirai, K. (1971) Ann. Sankyo Res. Lab. 23, 70-88
- Morgan, J.F., Morton, H.J. und Parket, R.C. (1950) Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 1-8
- Okai, Y. (1982) Febs Letters 149, 41-43
- Pelter, A. und Hansel R. (1968) Tetrahedron Letters 25, 2911-2916
- Penman, S. (1966) J. Mol. Biol. 17, 117-130
- Perry P., La Torre, J., Kelley, D.E. und Greenberg, J.R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 262, 220-226
- Poulson, R. (1973) in the Ribonucleic Acids, (Stewart, P.R. und Letham, D.S., Hsrg.), Springer Verlag Berlin, S. 243-259

- Pulvertaft, R.J.V. (1964) Lancet, 238-240
- Rademacher, J.G. (1848/51) in Rechtfertigung der verstandesrechten Erfahrungsheilkunde, Berlin, Bd. I, S. 140-147
- Rauen, H.M. und Schriewer, H. (1971) Arzneimittelforschung 21, 1194-1200
- Rave, N., Crkvenjakov, R. und Boedtker, H. (1979) Nucl. Acid Res. 6, 3559-3567
- Reber, J. u. E. (1960) in Leitfaden der Gewebezüchtung, Gustav-Fischer-Verlag, Jena
- Roeder, R.G. und Rutter, W. I. (1969) Nature 224, 234-337
- Romanov, G.A., Kuzmenko, A.P., Dashkevich, V.S., Salganik, R.I. und Vanyushin, B.F. (1984) Febs Letters 165, 35-38
- Rosen, H. (1980) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Sachs, L. (1978) in Angewandte Statistik, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 109-110
- Sajdel, E.M. und Jacob, S.T. (1971) Bioch. Biophys. Res. Comm. 45, 707-715
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. und Gey, G.O. (1953) J. exp. Med. 97, 695-710
- Schriewer, H., Penin, L., Rahmede, D., Riese, B., Rüther, N., The, L.G., Gebauer, B., Abu Tair, M. und Rauen, H.M. (1973) Arzneimittelforschung 23, 143

- Seglen, P.O. (1973) *Exp. Cell Res.* 76, 25-30
- Sheimin, R., Humbert, J. und Pearlman, R.E. (1978)
A. Rev. Biochem. 41, 277-316
- Sonnenbichler, J. und Bornkamm, G. (1967) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348, 1579-1588
- Sonnenbichler, J., Mattersberger, J. und Rosen, H. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1171-1180
- Sonnenbichler, J., Mattersberger, J. und Hanser, G. (1980)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1751-1756
- Sonnenbichler, J., Reichhart, F. und Tobien, M. (1977)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1647-1648
- Sonnenbichler, J. und Pohl, A. (1980) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1757-1761
- Sonnenbichler, J. und Zetl, I. (1984) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 555-566
- Träger, L. (1977) in *Steroidhormone*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Ventura, S.M. und Bullock, L.P. (1983) *Endocrin.* 112, 567-572
- Vogel, G. und Temme, I. (1969) *Arzneimittelforschung* 19, 3-7
- Wagle, S.R. und Ingebretsen, W.R. (1973) in *Meth. in Enzymol.* 35, 579-594

- Wagner, H., Hörhammer, L. und Munster, R. (1965) Naturwissenschaften 52, 305
- Wagner, H., Hörhammer, L. und Munster, R. (1968) Arzneimittelforschung 18, 688-696
- Wagner, H., Seligmann, O., Horhammer, L., Seitz, M. und Sonnenbichler, J. (1971) Tetrahedron Letters 22, 1895-1899
- Wagner, H., Seligmann, O., Seitz, M., Abrahma, D. und Sonnenbichler, J. (1976) Z. Naturforschung 31b, 876-884
- Waymouth, Ch. (1953) J. Nat. Canc. Inst. 22, 1003-1015
- Weil, P.A., Sidikaro, J., Stancel, G.M. und Blatti, S.P. (1977) J. Biolog. Chem. 252, 1092-1098
- Yu, F.L. (1974) Nature 251, 344-346
- Yu, F.L. (1975) Biochem. Biophys. Acta 395, 329-336
- Yu, F.L. und Feigelson, P. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2177-2180
- Zajdela, F. (1964) in Quelques problemes poses par la cellule cancreuse, Gauthiers-Villars, Paris, S. 914
- Zur Hausen, H. und Schulte-Holthausen, H. (1970) Nature 227, 245-248

Abkürzungen

AS	=	Ammoniumsulfat
cpm	=	counts per minute
DEAE	=	Diethylaminoethyl-
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
dpm	=	decay per minute
DTE	=	Dithioerythrit
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
GLDH	=	Glutamatdehydrogenase
GOT	=	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	=	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hepes	=	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
IE	=	Internationale Einheiten
i.p.	=	intraperitoneal
i.v.	=	intravenos
2-ME	=	2-Mercaptoethanol
PBS	=	phosphatgepufferte Salzlsg. n. Dulbecco, 1954
PEG	=	Polyethylenglykol
PMSF	=	Phenylmethansulfonylfluorid
SDH	=	Sorbit-Dehydrogenase
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
SIHS	=	Silibinin-2',3-dihydrogensuccinat, Na-salz
TCA	=	Trichloressigsäure
Tris	=	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

6.10.1947 geboren in München
 1952 - 1958 Volksschule, München
 1958 - 1964 St. Anna-Realgymnasium, München
 (Oberstufenreife)
 1964 - 1965 Städt. Höhere Frauenfachschole, München
 1965 - 1966 Arzthelferinnenschule Dr. Dirr, München
 1966 - 1972 Tätigkeit als Arzthelferin bei
 zwei Münchner Internisten
 1972 - 1981 techn. Assistentin im Max-Planck-Institut
 für Biochemie, Martinsried
 1973 - 1977 Abendgymnasium, München (Abitur)
 1977 - 1981 Studium der Pharmazie an der
 Ludwigs-Maximilians-Universität, München
 1. Staatsexamen: 24. August 1979
 2. Staatsexamen: 30. April 1981
 1981 - 1982 Ableistung des Apothekerpraktikums
 3. Staatsexamen: 5. Juli 1982
 Approbation 23. August 1982
 ab August 82 Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit
 am Max-Planck-Institut für Biochemie,
 Martinsried.

